KARINA LAWRENCE RAMOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS DISTRIBUIÇÕES
ESPACIAIS DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS
NA MIGRAÇÃO E INVASÃO DE UM
TUMOR CEREBRAL DE RATO *IN VIVO***

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2007

KARINA LAWRENCE RAMOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS DISTRIBUIÇÕES
ESPACIAIS DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS
NA MIGRAÇÃO E INVASÃO DE UM
TUMOR CEREBRAL DE RATO *IN VIVO***

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Biologia
Celular e do Desenvolvimento

Orientadora:
Profa. Alison Colquhoun
D. Phil. (Oxon)

São Paulo
2007

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

© reprodução total

Ramos, Karina Lawrence.

Análise comparativa das distribuições espaciais de moléculas envolvidas na migração e invasão de um tumor cerebral de rato in vivo / Karina Lawrence Ramos. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Alison Colquhoun.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e do Desenvolvimento. Linha de pesquisa: Migração de células tumorais.

Versão do título para o inglês: Comparative analysis of spatial distribution of molecules related to migration and invasion in a rat brain tumor in vivo.

Descritores: 1. Angiogênese 2. Células cultivadas de tumor 3. Matriz extracelular 4. Moléculas de adesão celular 5. Sistema nervoso central 6. Ratos I. Colquhoun, Alison II. Universidade de São Paulo III. Título.

ICB/SBIB194/2007

Ao meu filho **Cauê**, fonte da minha inspiração
constante.

Ao meu marido **João Paulo**, pelo amor irrestrito.

Aos meus pais, **Breno e Tania**, pelo esforço e
investimento na minha educação.

Aos meus irmãos (**Leonardo, Stephanie e Karla**) e
Amigos, pelo suporte e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente e com um especial carinho à minha orientadora, **Profa. Dra. Alison Colquhoun**, por esses 11 anos de convivência, aprendizado, paciência e compreensão. Não é possível listar aqui os inúmeros conselhos, ajudas, assistências que você me deu, mas eu lembro e valorizo cada um deles. Hoje posso dizer que sou uma proto-pesquisadora por sua causa! Muito mais que Boss, você é uma verdadeira amiga. Thank you very much!

Ao professor **Dr. Jarbas Arruda Bauer** pelo estímulo, respeito e pelos inúmeros e valiosos conselhos profissionais e pessoais. Por ter disponibilizado seu laboratório, tempo e principalmente sabedoria. Muito Obrigada “Tibúrcio”.

Aos meus queridos companheiros do Laboratório: **Juliano, Marcel, Priscila, Ângela, Alexandros, Margô, Débora** e todos outros colegas pela companhia agradabilíssima e ajuda nos experimentos nesses infintos anos de pós-graduação. Nossa turminha é mais que especial.

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Pires de Aguiar** pela oportunidade que me ofereceu em participar por 2 anos das discussões do Grupo de Tumores Cerebrais do Hospital das Clínicas. O conhecimento dos aspectos clínicos dos tumores cerebrais ajudaram a moldar e embasar essa tese. Obrigada ainda pelo acompanhamento das neurocirurgias e pela disponibilização de material para o presente trabalho.

À **Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn**, minha co-orientadora, pela ajuda na compreensão do universo dos proteoglicanos.

À Celiana, Beth e Heloísa pelo indispensável apoio administrativo.

Ao pessoal do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Ao pessoal da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pela atenção e exemplo profissional.

Aos demais professores, pós-graduandos e técnicos do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB - USP.

Aos meus amigos muito queridos, que me ajudaram nos momentos mais críticos da tese especialmente à Aline, a super-nanny, pela ajuda com o Cauê, pelas marmitas de madrugada e pelas palavras de incentivo. Valeu!

E finalmente, à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro.

“Science may set limits to
knowledge, but should not
set limits to imagination.”

Bertrand Russell

RESUMO

RAMOS, K.L. **Análise comparativa das distribuições espaciais de moléculas envolvidas na migração e invasão de um tumor cerebral de rato *in vivo***. 2007. 220 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O glioblastoma multiforme (GBM) é uma neoplasia primária do sistema nervoso central altamente invasiva e incurável. A reincidência pós-cirúrgica dos GBMs é de quase 100% dada a sua alta habilidade em invadir e migrar pelas estruturas cerebrais. A matriz extracelular (MEC) do cérebro pode ser remodelada não apenas pelas células de glioma, mas também pelos astrócitos reativos, microglia e células endoteliais. O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de diversas moléculas envolvidas com a migração e invasão de um modelo de GBM de rato *in vivo* (C6). Uma atenção especial foi dada às células das bordas do tumor que é o sítio preferencial de reincidência da doença. Ratos Wistar receberam 5×10^5 células de glioma C6 por injeção estereotáxica no striatum. Os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca após 28 dias do implante do tumor. As reações imunohistoquímicas foram realizadas em criocortes de $20 \mu\text{m}$ com o método anticorpo primário / anticorpo secundário biotinizado/ streptavidina – peroxidase. As células C6 expressaram tenascina-C, fibronectina, vitronectina, colágenos (I, III e IV), versican, brevican e agrecan, mas a tenascina-R foi observada apenas na região da cicatriz glial. Uma expressão aumentada de vitronectina, fibronectina, colágeno tipo I, versican e das subunidades alfa v e beta 1 das integrinas foi observada nas células C6 migrando ao longo dos vasos e nas bordas dos tumores. Essas moléculas foram em geral imunomarcadas pericelularmente nesses sítios. O MMP-2 foi fortemente expresso pelo tumor principalmente pelas células migrando ao longo dos vasos. Por outro lado, a expressão de MMP-9 não foi observada. Tanto o receptor de motilidade mediado por ácido hialurônico (RHAMM), quanto o CD44 foram expressos por C6 *in vivo*. No entanto, a imunomarcagem de RHAMM foi muito maior do que a de CD44. As áreas proliferativas do tumor expressaram baixas quantidades das moléculas aqui estudadas. Moléculas envolvidas com a angiogênese (COX-2, VEGF, flt-1 e flk-1) foram expressas pelo tumor. Os receptores de VEGF, flt-1 e flk-1, foram expressos tanto pelos endoteliócitos como pelas próprias células tumorais. Concluiu-se que o modelo de GBM é capaz de alterar a MEC tanto do tumor como do tecido cerebral normal. Nas bordas do tumor e nas células C6 migrando ao longo dos vasos observou-se uma organização especializada e pericelular da MEC. A análise das expressões de RHAMM e CD44 sugere um papel mais importante do RHAMM no reconhecimento do ácido hialurônico circundante. As expressões de flt-1 e flk-1 pelas células tumorais sugere um papel desses receptores de VEGF na proliferação do tumor *per se*. A não expressão das moléculas estudadas nos sítios proliferativos dos tumores analisados evidencia que as células em divisão não estão migrando, isto é, células em migração precisam parar para proliferar. Assim, as terapias anti-proliferativas convencionais (quimioterapia e radioterapia) não seriam efetivas contra essas células migrantes. Como as células infiltrativas são as maiores responsáveis pela reincidência dessa neoplasia, então as moléculas aqui estudadas são potenciais alvos para uma terapia anti-migratória adjuvante às terapias anti-proliferativas clássicas.

Palavras-chave – Glioma, migração, invasão, matriz extracelular, angiogênese, moléculas de adesão

SUMMARY

RAMOS, K.L. **Comparative analysis of the spatial distribution of molecules related to migration and invasion in a rat brain tumour *in vivo***. 2007. 220 f. Thesis (PhD in Cell and Developmental Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Glioblastoma multiforme (GBM), the most malignant primary brain tumour, invades diffusely throughout the brain parenchyma causing a tumour re-incidence after surgery of almost 100%. The brain extracellular matrix (ECM) can be remodelled not only by glioma cells but by reactive astrocytes, microglia and vascular endothelial cells. The aim of the present study was to analyse the *in vivo* ability of C6 to express molecules involved in migration/invasion with focus at the tumour borders, the main site of re-incidence. Wistar rats received 5×10^5 C6 glioma cells by stereotaxic injection into the striatum and were killed by transcardiac perfusion after 28 days. Immunohistochemical detection was carried out on 20 μ m cryostat sections and was performed using a primary antibody/biotinylated secondary antibody/streptavidin-peroxidase method. While C6 cells expressed tenascin-C, fibronectin, vitronectin, collagens (I, III and IV), versican, brevican and aggrecan, tenascin-R was observed only in the region of the reactive astrocytes. An increased expression of vitronectin, fibronectin, collagen I, versican, α v and β 1 integrin subunits was seen in the cells migrating along blood vessels and at the tumour borders. These molecules were immunolabelled mainly at pericellular sites. MMP-2 was widely expressed by the tumour, mainly by the cells migrating along the blood vessels. On the other hand, MMP-9 was not expressed by the C6 tumour. Both CD44 and receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM) were expressed in the C6 GBM model. However, the immunolabelling of RHAMM was much stronger than CD44. The proliferative areas of the tumours expressed low amounts of the molecules studied. Angiogenesis related molecules (COX-2, VEGF, flt-1 and flk-1) were widely expressed by the tumour. The VEGF receptors, flt-1 and flk-1, were expressed not only by endotheliocytes but also by tumour cells. The C6 model can alter the ECM in both tumour and brain parenchyma. At tumour borders and in the C6 cells migrating along blood vessels there was a specialized pericellular organization of ECM. The CD44 and RHAMM analyses suggest a pivotal role of RHAMM and a lesser role of CD44 in cell-hyaluronic acid interactions. Flt-1 and flk-1 expression by tumour cells suggests a role of these VEGF receptors in C6 proliferation. The lack of expression of the studied molecules by proliferating cells shows that these cells are not migrating. Indeed, migrating cells must stop the migratory process in order to divide. Therefore, the usual anti-proliferative therapies (chemotherapy and radiotherapy) are ineffective against migrating cells. As these migrating cells are mainly responsible for the re-incidence of GBM, the molecules observed could be used as targets for new anti-cancer therapies.

Keywords – Glioma, migration, invasion, extracellular matrix, angiogenesis, adhesion molecules

LISTA DE ABREVIações

B- FABP - proteína ligante de ácidos graxos do cérebro
COX-2 - ciclooxigenase-2
DAB - 3,3' diaminobenzidina
EGF - fator de crescimento epidermal
EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal
FAK - quinase de adesão focal
FGF - fator de crescimento fibroblástico
FN - Fibronectina
GAGs - glicosaminoglicanas
GBM - glioblastoma multiforme
GFAP - proteína acídica fibrilar glial
GHAP - proteína glial ligante de hialuronato
GPI - glicosilfosfatidilinositol
HA - ácido hialurônico
HIF - fator de indução de hipóxia
HRP - horseradish peroxidase
LN - Laminina
MEC - matriz extracelular
MMP - metaloprotease de matriz
MT-MMP - metaloproteases de matriz ligadas à membrana
PDGF - fator de crescimento derivado das plaquetas
PTGs - proteoglicanos
RHAMM - receptor de motilidade mediada por ácido hialurônico
RNAm - ácido ribonucléico mensageiro
SNC - sistema nervoso central
TGF- β 1 - fator de transformação - β 1
TIMP - inibidor de MMP
TN-C - tenascina C
TN-R - tenascina R
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
VN - Vitronectina
WHO - World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Unidades dissacarídicas dos diferentes grupos de glicosaminoglicanas	19
Figura 2 - Síntese do ácido hialurônico e possíveis origens do HA intracelular	19
Figura 3 - Vias de sinalização HA-CD44	20
Figura 4 - Esquema representativo da organização do HA e PTGs na matriz extracelular ...	20
Figura 5 - Modelos estruturais das moléculas de aggrecan e versican	23
Figura 6 - (A) Domínios estruturais das tenascinas, (B) Relação estrutura-função da TN-C (B) Relação estrutura-função da TN-C	23
Figura 7 - As conexões da rede perineuronal.....	31
Figura 8 - Modelo estrutural da lamina basal.....	33
Figura 9 - Estrutura generalizada da molécula laminina.....	34
Figura 10 - Representação esquemática da molécula de fibronectina	34
Figura 11 - Representação esquemática das possíveis interações entre as células de glioma e os vasos sanguíneos do cérebro normal	46
Figura 12 - Subunidades α e β das integrinas e suas possíveis associações	60
Figura 13 - Resumo das principais vias de sinalização das integrinas.....	62
Figura 14 - Vias de sinalizações ativadas pela ligação HA-CD44	69
Figura 15 - Vias de sinalizações ativadas pela ligação HA-RHAMM	69
Figura 16 - Ações indiretas mediadas pelas MMPs.....	74
Figura 17 - Mecanismo de ativação da MMP-2	74
Figura 18 - Representação das principais vias de sinalização mediadas pelo VEGF-R2.....	81
Figura 19 - VEGF versus Hipóxia	83
Figura 20 - (A) Representação de alguns pontos referenciais para a injeção estereotáxica em ratos Wistar adultos(B) Prancha representativa das estruturas cerebrais presentes num corte feito 0,48 mm à frente do bregma.....	91
Figura 21 - Resumo de alguns processos envolvidos com a migração, invasão e angiogênese de uma hipotética célula C6 infiltrativa	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais ligantes das integrinas	61
Tabela 2 - Proteínas capazes de se associar fisicamente com integrinas	62
Tabela 3 - Descrição dos anticorpos primários usados	96
Tabela 4 - Descrição dos anticorpos secundários usados.....	97
Tabela 5 - Concentrações dos anticorpos primários usados	97
Tabela 6 – Resumo das reações imunohistoquímicas	154

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 1 - Características histológicas de GBMs humanos	156
Prancha 2 - Aspectos morfológicos do modelo C6 de GBM.....	157
Prancha 3 - Aspectos morfológicos do modelo C6 de GBM.....	158
Prancha 4 - Aspectos morfológicos do modelo C6 de GBM.....	159
Prancha 5 - Cortes coronais de cérebros de rato com tumor C6 implantado	160
Prancha 6 - Imunohistoquímica para GFAP no tumor C6.....	161
Prancha 7 - Imunohistoquímica para GFAP no tumor C6.....	162
Prancha 8 - Imunohistoquímica para B-FABP no tumor C6	163
Prancha 9 - Imunohistoquímicas para GFAP e B-FABP em células C6 em cultivo	164
Prancha 10 - Imunohistoquímicas para GFAP e B-FABP em GBM humano.....	165
Prancha 11 - Imunohistoquímicas para TN-C e TN-R no tumor C6.....	166
Prancha 12 - (Imagem A) Foto-montagens de imunohistoquímicas para a TN-R no tumor C6	167
Prancha 13 - Imunohistoquímicas para TN-C e TN-R em células C6 em cultivo	168
Prancha 14 - Imunomarcção para a FN em C6 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	169
Prancha 15 - Imunohistoquímicas para a VN em C6 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	170
Prancha 16 - Controle negativo da imunohistoquímica para VN no tumor C6.....	171
Prancha 17 - Imunohistoquímicas para VN no tumor C6.....	171
Prancha 18 - Imunohistoquímicas para VN e FN em GBM's humanos	172
Prancha 19 - Imunohistoquímicas para os Colágenos I, III e IV no tumor C6	173
Prancha 20 - Imunohistoquímicas para os Colágenos I, III e IV no tumor C6	174
Prancha 21 - Imunohistoquímicas para Colágeno I no tumor C6	175
Prancha 22 - Imunohistoquímicas para VN, Colágeno IV e Colágeno I no tecido normal...	176
Prancha 23 - Imunohistoquímicas para Colágeno I em GBMs humanos	177
Prancha 24 - Imunohistoquímicas para os Colágenos I, III e IV em células C6 em cultivo .	178
Prancha 25 - Imunomarcações para as proteoglicanas Versican, Brevican e Agrecan no tumor C6.....	179
Prancha 26 - Imunohistoquímicas para Agrecan, Brevican e Versican em células C6 em cultivo	180
Prancha 27 - Imunomarcações comparadas dos receptores de ácido hialurônico (RHAMM e CD44) no modelo C6 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	181
Prancha 28 - Imunohistoquímicas para CD44 em diferentes tecidos	182
Prancha 29 - Imunohistoquímicas para CD44 em GBM humano	183
Prancha 30 - Imunohistoquímicas para a subunidade $\beta 1$ das integrinas no tumor C6	184
Prancha 31 - Imunohistoquímicas para a subunidade $\beta 1$ das integrinas no tumor C6	185

Prancha 32 - Imunohistoquímicas para a subunidade $\beta 1$ das integrinas no tecido cerebral normal.....	186
Prancha 33 - Imunomarcações para a subunidade alfa v das integrinas no tumor C6.....	187
Prancha 34 - Imunohistoquímicas para as subunidades αv e $\beta 1$ das integrinas no tumor C6	188
Prancha 35 - Imunohistoquímicas para VEGF e COX-2 no tumor C6.....	189
Prancha 36 - Imunohistoquímicas para COX-2 em GBM humano	190
Prancha 37 - Imunohistoquímicas comparadas para VEGF, MMP-2, Flt-1 e Flk-1 no tumor C6.....	191
Prancha 38 - Imunohistoquímicas comparadas para MMP-2, Flt-1 e Flk-1 no tumor C6 ...	192
Prancha 39 - Imunohistoquímicas para a Flt-1 no tumor C6	193
Prancha 40 - Imunohistoquímicas para VEGF, FLT-1 e FLK-1 em células C6 em cultivo...	194
Prancha 41 - Imunohistoquímicas para Flk-1 e VEGF em GBM humano.....	195
Prancha 42 - Imunohistoquímicas para MMP-2 no tumor C6	196
Prancha 43 - Imunohistoquímicas para MMP-2 no tumor C6	197
Prancha 44 - Imunohistoquímica para MMP-2 no tumor C6.....	198
Prancha 45 - Imunohistoquímicas para MMP-2 e MMP-9 em GBM humano	199

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 A matriz extracelular do sistema nervoso central: histórico e caracterização	17
1.2 Cicatriz glial: uma profunda reestruturação da matriz extracelular do sistema nervoso central	37
1.3 Caracterização, classificação e aspectos clínicos dos gliomas.....	41
1.4 Alguns aspectos do processo migratório dos gliomas	43
1.4.1 O substrato	44
1.4.1.1 A membrana basal e o seu papel na migração de células de glioma.....	44
1.4.1.2 Outros elementos de matriz extracelular importantes na migração de gliomas.....	53
1.4.2 A adesão	58
1.4.2.1 As integrinas e os seus papéis na migração de gliomas.....	58
1.4.2.2 Os receptores de ácido hialurônico	68
1.4.3 A invasão.....	72
1.4.4 A angiogênese	78
2 OBJETIVOS	88
3 MATERIAIS E MÉTODOS	90
3.1 Cultivo das células C6.....	90
3.2 Preparo das células C6 para as reações imunohistoquímicas <i>in vitro</i>	90
3.3 Implante das células C6 em ratos	90
3.4 Retirada e fixação dos encéfalos.....	92
3.5 Corte e montagem das peças de tumores humanos	94
3.6 Reações imunohistoquímicas	94
3.7 Análise dos dados	98
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4.1 Caracterização morfológica do modelo C6 implantado	99
4.2 Imunomarcagem de GFAP e B-FABP como indicadores indiretos do grau de diferenciação dos tumores C6 <i>in vivo</i>	102
4.3 Imunodeteção de elementos de matriz extracelular	105
4.3.1 glicoproteínas adesivas TN-R e TN-C	105
4.3.2 glicoproteínas adesivas FN e VN.....	108
4.3.3 Colágenos I, III e IV.....	116
4.3.4 Proteoglicanas : Brevican, Versican e Agrecan.....	118
4.4 Imunodeteção de diferentes moléculas de adesão	121
4.4.1 Ligantes de ácido hialurônico: RHAMM e CD44.....	121
4.4.2 Subunidades das Integrinas: α_v e β_1	126
4.5 Imunodeteção de moléculas envolvidas com a angiogênese.....	128
4.5.1 Imunodeteção de COX-2	128
4.5.2 Imunodeteção de VEGF.....	131
4.5.3 Imunodeteção dos receptores de VEGF: Flk-1 e Flt-1	131
4.6 Imunodeteção de enzimas proteolíticas	134
4.6.1 MMP-2 e MMP-9.....	134
4.7 Discussão global	136
4.7.1 A organização pericelular dos elementos de matriz extracelular no modelo C6.....	136
4.7.2 A expressão de VEGF, Flt-1, Flk-1 e COX-2 no modelo C6: uma nova visão para moléculas antigas.	146
5 CONCLUSÕES.....	200
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	202

1 INTRODUÇÃO

1.1 A matriz extracelular do Sistema Nervoso Central: Histórico e Caracterização

Em abril de 1898, Camillo Golgi apresentou à Società Medico Chirurgica as suas observações acerca de uma fina estrutura reticular que envolvia os corpos celulares dos neurônios e que chegava a recobrir até as arborizações de terceira ordem dos dendritos. Aliás, não apenas Golgi, mas também outros pesquisadores da época como Donaggio, Martinotti, Ramón y Cajal e Meyer, descreveram um “envoltório neuronal” que aparecia freqüentemente nas impregnações incompletas desenvolvidas por Golgi (as conhecidas reações negras). A tenacidade com que alguns pesquisadores da época defendiam a idéia deste material estar ligado à barreira hematoencefálica, aliado aos freqüentes fracassos em evidenciar-se espaços intercelulares (principalmente por microscopia eletrônica) no Sistema Nervoso Central (SNC), levaram a uma grande resistência, por parte da comunidade científica, em aceitar a presença de uma substância intercelular, ou matriz extracelular, no parênquima cerebral (CELIO et al., 1998; CELIO e BLÜMCKE, 1994).

As hoje conhecidas **redes perineuronais**, ou neuropil, ainda levantam vários debates acerca de sua composição e função; mas o cenário de uma substância intersticial, composta de diferentes elementos de matriz extracelular (MEC), permeando todos os espaços livres do parênquima cerebral tem sido bem aceito.

Afora alguns breves comentários de Nissl e Alzheimer, poucos estudos foram levantados sobre o papel das redes perineuronais em situações patológicas no SNC. Em 1911, entretanto, um psiquiatra italiano chamado Besta evidenciou que as redes perineuronais permaneciam intactas mesmo quando os neurônios tinham sido severamente lesados e que modificações nos padrões de expressão das redes perineuronais pareciam independender dos neurônios. Desta forma, Besta concluiu que a rede perineuronal é uma estrutura morfológica de provável origem glial (CELIO et al., 1998; CELIO e BLÜMCKE, 1994).

As redes perineuronais são muito heterogêneas em sua composição e as redes associadas a diferentes tipos de neurônios podem apresentar, ou não, diferentes composições. Essas estruturas são identificadas tardiamente no desenvolvimento, quando a “circuitaria” do SNC está estabelecida e estabilizada. Apesar das elucubrações à respeito de sua função, a rede perineuronal pode ter um papel no reconhecimento e na formação de sinapses pela célula alvo dada a sua localização perisináptica e sua grande

heterogeneidade molecular. Enquanto as técnicas histoquímicas mais antigas permitiam apenas a identificação de grandes categorias de substâncias dentro da MEC do parênquima cerebral, hoje técnicas mais acuradas, como a imunohistoquímica, tornaram possível a identificação precisa de cada um dos componentes que isoladamente constituem essa estrutura (MATTHEWS et al., 2002).

Ao contrário da matriz de outros tecidos, a MEC do SNC é muito pobre em proteínas fibrilares, como os colágenos, que são encontradas principalmente nas membranas basais vasculares. Contudo, essa MEC apresenta altas concentrações de glicosaminoglicanas, que podem ser encontradas tanto ligadas a um eixo protéico, formando os conhecidos proteoglicanos, quanto livres, como é o caso do ácido hialurônico.

As **glicosaminoglicanas (ou GAGs)** são polissacarídeos não ramificados compostos de unidades dissacarídicas repetidas. Uma das unidades é sempre uma amino-ose, N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina, que freqüentemente encontra-se sulfatada. O outro resíduo pode ser tanto o ácido glucurônico quanto o ácido idurônico (Figura 1). A classificação de uma glicosaminoglicana dependerá de sua composição, sulfatação e do tipo de ligação entre os açúcares. Entre as glicosaminoglicanas podemos distinguir alguns grandes grupos: o ácido hialurônico, as GAGs condroitin sulfato, as GAGs dermatan sulfato, as GAGs heparan sulfato, a heparina e as GAGs queratan sulfato. Por apresentarem diversos grupos sulfato ou terminais carboxilato, as GAGs são moléculas negativamente carregadas e portanto muito hidrofílicas. Afora o ácido hialurônico que é a única GAG que não se liga a uma eixo protéico, todas as outras GAGs são encontradas ligadas à proteínas (STRYER, 1996).

O **ácido hialurônico (HA)**, a única GAG não sulfatada, é composto de centenas de repetições de N-acetilglicosamina e de ácido glucurônico e apresenta entre 10^6 e 10^7 kDa (Figura 4). Essa GAG é sintetizada preponderantemente na face interna da membrana plasmática pelas hialuronan sintases sob a forma de um polímero linear simples e é externalizada através de um canal ou poro sintase-dependente. Nesse aspecto o ácido hialurônico se distingue das outras GAGs que são sintetizadas por proteínas residentes no complexo de Golgi das células. Na superfície da célula o HA pode interagir com diferentes receptores (como o CD44), ser endocitado e funcionar como um sinalizador para eventos como a migração e a proliferação celular. A síntese de HA pode acontecer dentro de estruturas de membrana chamadas caveolae, nas vesículas intracelulares e até mesmo nas membranas nucleares (Figura 2).

Figura 1: Unidades dissacarídicas dos diferentes grupos de glicosaminoglicanas (GLYCOFORUM, 2006a).

Figura 2: Síntese do ácido hialurônico e possíveis origens do HA intracelular. **(a)** O HA é sintetizado preponderantemente na face interna da membrana plasmática pelas HA sintases e pode ser externalizado da célula via um poro sintase-dependente. Na superfície celular o HA pode sofrer endocitose após interagir com diferentes receptores e proteínas específicas de ligação. Este HA poderá ser degradado ou realizar funções alternativas dentro da célula. **(b)** A síntese de HA também pode ocorrer nas HA sintases presentes em caveolae, nas vesículas intracelulares ou nas membranas nucleares. **(c)** O HA pode ser direcionado diretamente para a face extracelular da célula ou para sítios intracelulares. **(d)** As HA sintases podem ainda sintetizar e liberar pequenas quantidades de chito-oligosacarídeos sob certas condições tais como a ligação de proteínas regulatórias e a queda da concentração de substrato (UDP-GlcA). (Figura adaptada de LEE e SPICER, 2000)

Figura 3: Vias de sinalização HA-CD44. A ligação HA-CD44 pode ativar diversas cascatas de sinalização que resultam em alterações na proliferação e motilidade celular. **(a)** A ativação independente de receptores tirosina quinase da família src pode ser dependente da co-localização do CD44 e das src quinases em microdomínios lipídicos da membrana plasmática. Esta via leva a ativação da cascata da proteína quinase C (PKC). **(b)** Os dímeros CD44-erbB2 podem ativar a tanto a cascata da MAP quinase, quanto outras cascatas. **(c)** O NF-κB pode ser ativado através do Ras numa cascata PKCζ-dependente. **(d)** A interação HA-CD44 pode modificar a polimerização do citoesqueleto adjacente através da ativação de GTPases como Rho e Rac1 (Figura adaptada de LEE e SPICER, 2000).

Figura 4: Esquema representativo da organização do HA e PTGs na matriz extracelular. O HA pode interagir, através de proteínas ligantes, com diferentes PTGs formando um rede altamente hidrofílica no parênquima cerebral.

A ligação HA-CD44 ativa diferentes vias através de proteínas intermediárias, como as GTPases Rho e Rac1, que levam à uma reorganização dos filamentos de actina. Um outro fato curioso é que os fragmentos de HA de até 2×10^5 Da são capazes de ativar o fator de transcrição nuclear NF- κ B, mas fragmentos acima de 1×10^6 Da apresentam um efeito inibitório. Estas ações tão diversas são mediadas pelo mesmo receptor de superfície celular, o CD44, e evidenciam a complexidade das vias mediadas pelo HA (Figura 3).

Contudo, o HA sintetizado pode também ser diretamente direcionado para sítios intracelulares e, curiosamente, esse HA intracelular é dinamicamente regulado durante o ciclo celular de uma forma distinta do HA incorporado por endocitose. Quatro ligantes de HA intracelular foram identificados: o RHAMM (do inglês “receptor for hyaluronan-mediated motility”), o P32, o IHABP4 e a hsp90-cdc37. Embora o RHAMM possa associar-se transientemente com a superfície celular, é mais comum encontrá-lo ligado ao citoesqueleto de actina e aos microtúbulos, sítio onde ele se co-localiza com a proteína ERK1. O RHAMM apresenta um importante papel na sinalização mitógeno ativada de ERK1 e é requerido nas cascatas de sinalização de Ras e Src (NOVAK e KAYE, 2000; STRYER, 1996; LEE e SPICER, 2000; EVANKO e WIGHT, 1999).

Diversos estudos evidenciaram que o HA apresenta um importante papel como organizador estrutural e biofísico da matriz extracelular. O HA é freqüentemente encontrado ligado às hialaderinas, uma classe de proteoglicanos, numa interação mediada por pequenas proteínas globulares (Figura 4). Além de ligar-se a outros elementos de matriz, o HA pode também modificar as propriedades desses elementos interferindo no meio extracelular/pericelular e, por este motivo, muitos pesquisadores se atêm ao papel do HA sobre a capacidade migratória de células morfogênicas e tumorais (NOVAK e KAYE, 2000).

O HA é abundantemente encontrado durante o desenvolvimento, estágio onde a migração celular é bastante intensa, durante processos de cicatrização e em tumores. A concentração de HA nos tecidos é controlada principalmente pelas hialuronidases (HYAL1, HYAL2 e HYAL3) que são enzimas expressas diferencialmente durante o desenvolvimento. No SNC, o HA é muito abundante mesmo no indivíduo adulto, mas um fato interessante é que em gliomas de alto grau de anaplasia a concentração de HA chega a ser maior que a concentração do próprio cérebro. Muitos estudos têm mostrado que o HA é sintetizado preponderantemente por células gliais, contudo não se sabe ao certo qual tipo celular específico é responsável pela produção dessa glicoaminoglicana, se astrócitos tipo 1, progenitor O-2A, oligodendrócitos ou astrócitos tipo 2 (MARRET et al., 1994).

O **agrecan**, o **versican**, o **neurocan** e o **BEHAB/Brevican** são membros da família dos proteoglicanos condroitin sulfato e se ligam ao HA, motivo pelo qual também são denominados lecticans. Esses proteoglicanos contêm domínios N-terminais, semelhantes aos domínios imunoglobulinas, seguidos por repetições em “tandem” onde se encontram os sítios de ligação com o HA. Estas moléculas apresentam na sua região C-terminal domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF), lectinas e proteínas reguladoras de complemento (Figura 5).

Dentre esses lecticans apenas o **neurocan** e o **brevican** apresentam expressão exclusiva no SNC, todavia todos parecem ter um papel indispensável durante o desenvolvimento neural (MILEV et al., 1998). O **agrecan** é o maior proteoglicano encontrado no parênquima cerebral e consiste de um eixo protéico de 210 kDa ligado à 130 cadeias de GAGs condroitin sulfato e queratan sulfato (Figura 5). Em cérebros de rato o **agrecan** é expresso em concentrações crescentes durante o desenvolvimento, chegando ao platô máximo no quinto mês pós-natal quando a sua concentração é mantida. Matthews e colaboradores evidenciaram a presença de **agrecan** no córtex cerebral, no núcleo cerebelar profundo, no colículo superior, no giro denteado, na medula espinhal e em diversas regiões (CA1, CA2 e CA3) do hipocampo. Com técnicas de hibridização *in situ* e imunomarcação estes pesquisadores sugeriram uma origem predominantemente neuronal para o **agrecan**, dado que não foi encontrada uma sobreposição de marcação entre o anticorpo para **agrecan** (Cat-3xx) e GFAP (um filamento intermediário glial). Este dado sugere que os neurônios também teriam um papel na síntese e remodelação da MEC que os circunda. Além disso, a glicosilação diferencial da molécula de **agrecan**, que gera até sete glicoformas diferentes, pode interferir substancialmente na composição das redes perineuronais, o que poderia representar um mecanismo de geração de diversidade neuronal. No entanto, o papel preciso do **agrecan** no cérebro continua incerto (MATTHEWS et al., 2002).

O **versican** apresenta quatro diferentes isoformas, resultantes de “splicing” alternativo e liga-se a GAGs condroitin sulfato (Figura 5). Enquanto as isoformas V0 e V1 são relativamente raras, a isoforma V2 é considerada um importante componente de MEC no cérebro adulto e também é bem expressa em gliomas. Os maiores produtores de **versican** no cérebro são os astrócitos e os oligodendrócitos. A clivagem proteolítica da molécula de **versican** pode gerar produtos, as chamadas hialuronectinas e a proteína glial ligante de hialuronato (GHAP), que são capazes de ligar-se ao HA. O GHAP foi identificado em 1989 por Perides e colaboradores e consiste do N-terminal clivado (60kDa) do **versican**.

Figura 5: Modelos estruturais das moléculas de agrecan e versican. A representação abaixo mostra a organização dos domínios peptídicos. HABR = região de ligação com o HA, GAG = domínio de ligação com glicosaminoglicanas, EGF = repetições semelhantes à EGF, LEC = módulo “C-type lectin-like”, C = módulo semelhante à proteína regulatória de complemento (GLYCOFORUM, 2006b).

Figura 6: (A) Domínios estruturais das tenascinas. Todos os membros da família das tenascinas, exceto a tenascina-W (TN-W), apresentam variantes, decorrentes de “splicing” alternativo, que diferem pelo número de domínios fibronectina tipo III. Para a tenascina-C (TN-C) e a tenascina -R (TN-R) os domínios que sofrem “splicing” estão representados em laranja. Para a TN-X e a TN-Y foram representadas as menores variantes, ambas moléculas apresentam dois sítios de “splicing” que estão indicados por setas (adaptado de JOESTER e FAISSNER, 2001). **(B)** Relação estrutura-função da TN-C. Acima - principais sítios de ligação da TN-C com outras moléculas ou receptores. Abaixo - resumo das principais funções da TN-C (adaptado de JOESTER e FAISSNER, 2001).

Estudos *in vitro* mostraram que diversas proteinases como gelatinases, colagenases e a estromelisina podem clivar o versican gerando GHAP; contudo, os papéis do versican e do GHAP ainda são foco de estudo (MILEV et al., 1998; NOVAK e KAYE, 2000; PERIDES et al., 1989, OOHIRA et al., 2000).

Outro proteoglicano condroitin sulfato encontrado no cérebro é o **neurocan**. Essa molécula apresenta uma similaridade de 60% com o versican e o agrecan no seu domínio de ligação com o HA. Assim como o versican, o neurocan apresenta diferentes isoformas, de 68 kDa à 136 kDa e 32 kDa, resultantes do “splicing” alternativo de seu RNAm ou do processamento diferencial de seu eixo protéico. A expressão de neurocan é regulada durante o desenvolvimento e sua função parece estar relacionada com a inibição do crescimento dos neuritos e adesão neuronal. O neurocan é sintetizado por neurônios e estudos com hibridização *in situ* evidenciaram sua presença nas células granulosas cerebelares, nas células de Purkinje, nos neurônios da formação hipocampal, no córtex, no *caudato putamen*, no neuroepitélio telencefálico basal, no epêndima e na medula espinhal. Além disso, algumas áreas do cérebro expressam o RNAm de neurocan, mas não a sua proteína. A expressão de neurocan aumenta principalmente nos estágios finais da embriogênese e declina abruptamente no período pós-natal, o que indica um papel desse proteoglicano no desenvolvimento (NOVAK e KAYE, 2000; GRUMET et al., 1994).

O proteoglicano mais recentemente identificado na família dos proteoglicanos ligantes de HA, o **brevican** (ou BEHAB), é expresso exclusivamente no SNC. Esse apresenta duas isoformas, uma secretada e a outra ancorada à membrana plasmática via um glicosilfosfatidilinositol (GPI). As isoformas de Brevican são decorrentes do “splicing” alternativo de seu RNAm e a forma secretada parece ter uma origem neuronal, enquanto a isoforma ancorada é sintetizada por células gliais. Assim, enquanto a forma secretada exerce a função de MEC, a forma ancorada age como um receptor celular para essa MEC. Diferentes trabalhos mostraram que a expressão de brevican, tanto ancorado quanto secretado, está relacionada com a migração de células gliais durante o desenvolvimento neural, no processo de astrogliose e em tumores cerebrais primários. O brevican é expresso no cérebro adulto tanto na substância cinzenta quanto na branca, e a sua imunomarcagem denota um papel importante na formação das redes perineuronais. Na substância branca o brevican é sintetizado pelos oligodendrócitos preponderantemente na sua forma ancorada. Segundo Jaworski e colaboradores foi possível identificar (via hibridização *in situ*) a expressão intensa dos transcritos de brevican no corpo caloso, na fímbria hipocampal, nos tractos de substância branca, nos neurônios CA1 do hipocampo, nas células de Purkinje e

nas células tipo II de Golgi. Seidenbecher e colaboradores mostram ainda que a forma secretada é vastamente encontrada nos neurônios corticais do cérebro adulto, na região CA3 do hipocampo, no giro denteado e nas células granulosas cerebelares. Entretanto, os estudos de localização da expressão de brevican durante o desenvolvimento ainda são alvos de discussão. Enquanto alguns sugerem que a forma secretada está associada com células gliais, principalmente no período de desenvolvimento pós-natal, outros identificaram esta isoforma associada ao pericário de neurônios. A função do brevican ainda é muito discutida, mas sugere-se um papel na motilidade glial, na adesão celular, no crescimento de neuritos, na estabilização das conexões sinápticas e na invasão tumoral. (NOVAK e KAYE, 2000; SEIDENBECHER et al., 1998; JAWORSKI et al., 1999; GARY et al., 2000; THON et al., 2000).

Outros proteoglicanos presentes na MEC do SNC são da família dos pequenos **proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs)** como o decorin, o biglican, o fosfacan, o testican, o perlecan, o distroglican, o agrin, o claustrin, o glipican entre outros. Ao contrário dos lecticans estes proteoglicanos não se ligam ao HA.

Além do HA e dos proteoglicanos, as **glicoproteínas adesivas** também exercem um papel indispensável na estruturação da MEC do SNC.

As **tenascinas** são glicoproteínas envolvidas tanto nas interações neurônio-glia quanto em efeitos inibitórios e estimulatórios das funções neuronais durante o desenvolvimento. Esta família de glicoproteínas apresenta cinco membros: a tenascina-C (TN-C), a tenascina-R (TN-R), a tenascina-X (TN-X), a tenascina-Y (TN-Y) e a tenascina-W (TN-W). Cada cadeia polipeptídica de uma molécula de tenascina apresenta diferentes domínios como: domínios repetidos e semelhantes à EGF, domínios semelhantes à fibronectina tipo III e seqüências homólogas ao fibrinogênio no seu C-terminal (Figura 6A – página 23). O domínio N-terminal destas cadeias apresenta uma série de cisteínas e heptâmeros repetidos que estão envolvidos na multimerização da molécula (JOESTER e FAISSNER, 2001)

Em condições normais a TN-C apresenta-se como um hexâmero e a TN-R como um trímero (Figura 6A – página 23), as outras tenascinas (W, X e Y) não são encontradas na forma multiméricas (JOESTER e FAISSNER, 2001).

No SNC são expressas as tenascinas C, R e Y sob condições espaço-temporais muito restritas. A TN-C é expressa no início do desenvolvimento embrionário de camundongos e é sintetizada pelos astrócitos imaturos, por subpopulações da glia radial e por astrócitos reativos. Além disso, neurônios imaturos (como as células granulosas do

hipocampo, alguns motoneurônios da medula espinhal e subpopulações de neurônios da retina) também são capazes de sintetizar TN-C. No entanto, a expressão de TN-C no SNC apresenta-se discreta e com um padrão de marcação similar a um envoltório que, aparentemente, correlaciona-se com as divisões neuroanatômico-funcionais. Assim, a TN-C é encontrada envolvendo o córtex somato-sensorial e na interface dos compartimentos da via nigro-striatal durante o desenvolvimento (JONES e JONES, 2000; JOESTER e FAISSNER, 2001).

A TN-C apresenta ainda duas isoformas mais comuns, diferenciadas por seu tamanho, que sugerem diferentes funções para essa glicoproteína. A isoforma de peso molecular maior, chamada de TN-C grande, relaciona-se com processos de migração celular e remodelação de tecidos, como a migração dos neurônios cerebelares pelas fibras de Bergmann, a inibição da migração de oligodendrócitos e seus precursores e a progressão de glioblastomas multiformes. Por muito tempo considerou-se que a TN-C fosse ausente no cérebro adulto, no entanto, a sua expressão pode ser encontrada em regiões que mantêm certo grau de plasticidade como os núcleos hipotalâmicos e o sistema olfatório. A TN-C pode ser encontrada ainda associada a regiões lesadas, em casos de esclerose e em processos neoplásicos - que serão discutidos com detalhes posteriormente (JONES e JONES, 2000; JOESTER e FAISSNER, 2001).

Diferentes receptores para TN-C têm sido descritos, entre eles as integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_9\beta_1$ e $\alpha_8\beta_1$ que podem ligar-se tanto aos domínios fibronectina III, quanto ao domínio fibrinogênio da TN-C. Assim como outros elementos de MEC, os proteoglicanos condroitin sulfato, como o fosfacan, podem ligar-se à TN-C. O fosfacan é uma variante do RPTP ζ/β (receptor da proteína tirosina fosfatase), o que sugere um provável papel da TN-C na via de transdução de sinais. A TN-C também apresenta sítios de ligação com colágenos e com a heparina (Figura 6B – página 23).

Inicialmente a TN-C foi caracterizada com uma glicoproteína anti-adesiva no SNC. De fato, estudos *in vitro* mostraram que na presença de elementos de MEC mais permissíveis, tais como laminina e proteoglicanos, a TN-C inibia o crescimento de neuritos. No entanto, estudos com substratos puros de TN-C evidenciaram que esta glicoproteína apresenta um forte papel de estimulador do crescimento axonal. O fato de agir de forma linhagem-dependente durante a diferenciação neuronal, aliado a sua capacidade de estimular ou não o crescimento axonal evidencia a multifuncionalidade da TN-C. Ademais, um resultado intrigante relacionado à TN-C é que, mesmo apresentando uma gama de ações tão claras durante o desenvolvimento neuronal, camundongos nocaute para TN-C não apresentaram

infertilidade nem qualquer alteração fenotípica, neurológica ou sistêmica. Por outro lado, foi observada uma redução na coordenação motora e no comportamento exploratório destes animais, indicando um papel da TN-C na sinaptogênese. Já os modelos de lesão neuronal em ratos TN-C^{-/-} evidenciaram um papel central da TN-C na cicatrização (JONES e JONES, 2000; JOESTER e FAISSNER, 2001).

A síntese de TN-C pode ser induzida, ou reprimida, por diferentes fatores produzidos por tecidos embrionários, tecidos em remodelação, tecidos patológicos ou em processo de cicatrização. Em diferentes tecidos a expressão de TN-C pode ser modulada de forma célula-dependente por: soro fetal bovino, EGF (fator de crescimento epidermal), FGF (fator de crescimento fibroblástico), TGF- β 1 (fator de transformação - β 1), TNF- α (fator de necrose tumoral), interleucina-1, fator de crescimento de nervos (NGF) entre outros. Uma característica interessante é que alguns destes fatores só modulam a TN-C se a célula estiver em um status de crescimento específico (como a ativação de ras e c-jun) o que sugere que a transformação neoplásica seja uma premissa para a síntese de TN-C por tumores (JONES e JONES, 2000; JOESTER e FAISSNER, 2001).

A TN-C em geral é co-expressa com metaloproteases como a metaloprotease-2 (MMP-2). Um fato interessante é que ambas, TN-C e MMP-2, são capazes de se ligar à integrina $\alpha_v\beta_3$ sugerindo um papel mútuo na remodelação da MEC durante o desenvolvimento. Mais intrigante ainda é o fato que as MMPs podem regular a expressão de TN-C, como foi evidenciado em estudos com tecidos mamários. É sugerido que este controle seja feito através da liberação, via MMP, de fatores de crescimento aprisionados na MEC pericelular ou ainda através da ação das MMPs sobre sítios de adesão celular ricos em integrinas.

A TN-C e a TN-R compartilham uma homologia estrutural grande e por isso muitas discussões são levantadas a respeito das suas prováveis similaridades funcionais. A **TN-R** (ou restrictina) é uma glicoproteína exclusiva do SNC e apresenta duas isoformas (160 e 180 kDa) principais, além de duas isoformas geradas por “splicing” alternativo. Uma característica estrutural interessante dessa glicoproteína é que as isoformas de 160 kDa formam dímeros enquanto as de 180 kDa são capazes de formar trímeros. Em sua cadeia foram encontrados diversos sítios de potencial glicosilação N-ligada e O-ligada e no cérebro adulto de diversos vertebrados a TN-R expressa baixos níveis de condroitin sulfato; contudo essa expressão é diferencial dependendo das regiões do cérebro sugerindo um papel similar a um proteoglicano condroitin sulfato, porém espaço-temporal dependente (WOODWORTH et al., 2004).

A TN-R é expressa por oligodendrócitos e alguns grupos de neurônios como os pequenos interneurônios inibitórios do córtex cerebelar, motoneurônios da medula espinhal e do cérebro e as células horizontais da retina. No cérebro de mamíferos a TN-R é detectada perinatalmente sob a isoforma de 180 kDa. Tanto a proteína quanto o RNAm da TN-R são detectados amplamente na substância branca durante a migração dos precursores de oligodendrócitos e também durante a fase de mielinização ativa, momento no qual a TN-R torna-se muito abundante na substância branca de diferentes regiões do SNC. Após o período de intensa mielinização tanto a concentração da proteína quanto do RNAm caem abruptamente e se mantêm em níveis baixos no cérebro adulto. No SNC adulto a TN-R aparece predominantemente associada à superfície dos oligodendrócitos, axônios mielinizados e nódulos de Ranvier. Conforme vai acontecendo a maturação neuronal a TN-R passa a se acumular nas redes perineuronais dos interneurônios e motoneurônios muitas vezes se co-localizando com a TN-C. Aparentemente a expressão de TN-R nas redes perineuronais de interneurônios e motoneurônios é um padrão em diferentes regiões do SNC adulto como no córtex, hipocampo, cerebelo, retina e medula espinhal. Além disso, Fuss et al. (1993) mostraram que no cérebro adulto a expressão de TN-R pelos neurônios não é diminuída, o que evidenciou uma regulação diferencial por parte de neurônios e oligodendrócitos durante o desenvolvimento (WOODWORTH et al., 2004; FUSS et al., 1993).

Os estudos da expressão de TN-R em tecido lesado têm sido desenvolvidos com dois diferentes tipos de modelos experimentais: (1) a lesão de nervos cranianos (facial ou hipoglosso) seguida da análise da expressão de TN-R no parênquima cerebral e (2) a lesão diretamente no parênquima cerebral. O segundo modelo, ao contrário do primeiro, leva a uma quebra da barreira hematoencefálica no sítio da lesão assim como uma supressão do crescimento axonal e a formação de uma cicatriz glial. Após a lesão do fórnix da comissura posterior de ratos observou-se um aumento da expressão de TN-R no sítio de lesão o que sugere um provável papel dessa glicoproteína tanto na formação da cicatriz astrogliar, como na inibição do crescimento axonal pós-lesional. A expressão de TN-R foi muito aumentada na região da lesão e apresentou um padrão de expressão muito similar ao dos proteoglicanos condroitin sulfato que sabidamente agem como inibidores da regeneração axonal no SNC de mamíferos adultos. Estudos mostram que a expressão de TN-R pode ser regulada por citocinas e fatores de crescimento como o TNF- α (fator de necrose tumoral α) e o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas). (PESHEVA e PROBSTMEIER, 2000; JONES e JONES, 2000; JOESTER e FAISSNER, 2001; FUSS et al., 1993).

Também foram encontrados transcritos (RNAm) de TN-R em neoplasias cerebrais primárias, contudo a sua expressão protéica não havia ainda sido demonstrada em tumores cerebrais (CARNEMOLLA et al., 1996).

Os primeiros estudos sobre as funções da TN-R na migração celular mostraram que essa glicoproteína apresenta uma ação anti-adesiva considerável, o que sugere a existência de uma resposta celular mediada por receptores na superfície da célula. Contudo, as propriedades adesivas da TN-R dependerão do tipo celular que a expressa, do momento durante o desenvolvimento em que ela é sintetizada, das suas modificações pós-translacionais, do repertório de receptores expressos pelas células adjacentes e dos mecanismos de sinalização intracelular. A ação inibitória da TN-R sobre o crescimento axonal de diferentes neurônios não é dependente dos substratos adesivos presentes (como, por exemplo, a LN e o colágeno tipo I) e é mediada pela ligação do domínio semelhante à EGF da TN-R com o domínio imunoglobulina da proteína F3/F11 (GPI-ancorada) presente nos neurônios. Contudo, esta independência de outros substratos na ação da TN-R sobre a adesão celular não é verdadeira para outros tipos celulares como oligodendrócitos, células precursoras tipo 0-2A, células de Schwann e alguns tipos de neurônios. Quando oferecida misturada a outros substratos a TN-R inibe seletivamente a adesão mediada por Fibronectina (FN) e o crescimento de neuritos. O papel anti-adesivo da TN-R em conjunto com a FN residiria na sua interação com disialogangliosídeos da superfície celular, o que interferiria na ligação RGD-dependente das integrinas com a FN. Convém ressaltar que os disialogangliosídeos podem disparar cascatas de sinais intracelulares que afetam a fosforilação da quinase de adesão focal (FAK) e a adesão integrina-dependente. Além disso, a TN-R é capaz de ligar-se diretamente à FN e a sua ação inibitória decorre da presença de glicosaminoglicanas condroitin sulfato ligadas à sua cadeia protéica; essas GAGs competiriam com os proteoglicanos da superfície celular que são responsáveis pela ligação com o domínio heparina da molécula de FN. A alta expressão de certos disialogangliosídeos (GD2 e o GD3) e integrinas em células tumorais como neuroblastomas, gliomas e melanomas sugerem um papel no crescimento e migração tumoral. Além disso, as células neoplásicas apresentam uma preferência em migrar pelos tractos de substância branca no SNC o que sugere um papel crucial da TN-R no controle da interação integrina-ECM durante a progressão tumoral. Apesar das suas propriedades anti-adesivas para com neurônios e células da microglia, a TN-R pode apresentar-se como um substrato adesivo para células da glia como os astrócitos e oligodendrócitos. A forma como os astrócitos interagem com a TN-R ainda é foco de estudos dado que, ao contrário de neurônios e oligodendrócitos, essas

células não expressam a molécula F3/F11 (PESHEVA e PROBSTMEIER, 2000; PROBSTMEIER et al., 1999; CHEUNG et al., 1985; BURNS et al., 1988; PAULUS et al., 1993; WOODWORTH et al., 2004).

Assim como outras moléculas com estruturas multidomínio da MEC, a TN-R está envolvida em interações homofílicas e heterofílicas. As duas isoformas de TN-R podem interagir com FN e colágeno tipo I, mas não com colágeno tipo IV e LN. A interação com a FN é um bom exemplo das similaridades funcionais da TN-R e TN-C, dado que esta última também é capaz de interagir com a FN. A TN-R é capaz ainda de interagir com diferentes lecticans (o agrecan, o versican, o brevican e o neurocan) via os seus domínios lectina tipo C. Estas interações são cálcio-dependentes e o brevican parece ser o ligante de maior afinidade. O fosfacan é outro ligante de alta afinidade da TN-R e é capaz de se co-localizar com essa glicoproteína na MEC de diferentes regiões do SNC. Além disso, as cadeias de GAG condroitin sulfato ligadas à TN-R parecem estar envolvidas na interação com a TN-C formando complexos grandes cuja função ainda não foi investigada (FAISSNER et al., 1990; PESHEVA et al., 1994).

O conjunto de todas as observações acerca da distribuição espaço-temporal da TN-R sugerem um papel na estruturação macromolecular das redes perineuronais devido (1) às suas interações com diferentes elementos de MEC, como os lecticans e FN e (2) às suas interações homofílicas cálcio-dependentes. Contudo, dado que camundongos nocaute para a TN-R desenvolvem-se normalmente, muitos estudos serão necessários para a elucidação do real papel dessa glicoproteína durante o desenvolvimento do SNC e em doenças (PESHEVA e PROBSTMEIER, 2000).

Com as informações supracitadas e a caracterização dos elementos de MEC que constituem as redes perineuronais (GAGs, proteoglicanos e glicoproteínas) pode-se prever um cenário hipotético das interações dessas moléculas no parênquima cerebral. A Figura 7 propõe um modelo de organização da rede perineuronal mostrando ainda a influência do tratamento enzimático com condroitinase B sobre a estabilidade dessa matriz extracelular tão especializada (figura 7 adaptada de FOX e CATERSON, 2002).

Além dos elementos de MEC presentes nas redes perineuronais, o cérebro também apresenta a matriz extracelular constituinte das membranas basais dos vasos. No cérebro humano as membranas basais podem ser encontradas nos vasos (subendotelial, glial e membranas basais do músculo liso), na limitante externa da glia (membrana basal subpial) e abaixo das células epiteliais do plexo coróide.

Figura 7: As conexões da rede perineuronal (A): As redes perineuronais recobrem os corpos celulares e dendritos proximais dos neurônios. Estas redes são compostas por diversas classes de proteoglicanos de condroitin sulfato (CSPGs). Dentre os CSPGs existe a subfamília das lecticans, composta por neurocan - Nn, Versican-Vn, brevican-Bn e agrecan-An, que são capazes de ligar-se não covalentemente ao HA (em rosa). A ligação entre o HA e as lecticans acontece através de uma região globular do amino-terminal dos proteoglicanos, onde encontram-se os domínios de ligação com o HA (círculos amarelos). Estas associações resultam nos grandes agregados macromoleculares da rede perineuronal. Além disso, associações não covalentes podem ocorrer entre o terminal carboxil (círculos brancos) de algumas lecticans, como neurocan e versican, e certas glicoproteínas de matriz, como a tenascina (T, triângulos). A tenascina também pode se ligar à GAGs de condroitin sulfato (linhas vermelhas) presentes no fosfacan, nas lecticans ou em proteoglicanos ligados à superfície celular (como é o caso da neuroglicano C e da NG2). O fosfacan pode ainda ligar-se à receptores de superfície celular, como as moléculas neurais de adesão celular (NCAM), através de suas cadeias de condroitin sulfato. No esquema foram representadas duas variantes de versican (em azul) assim como as variantes da clivagem proteolítica de neurocan: o neurocan-N (Nn-N), que apresenta-se ligado ao HA, e o neurocan-C (Nn-C), que apresenta-se ligado à rede perineuronal através de uma interação com a tenascina e com cadeias de condroitin sulfato. Tratamento com condroitinase B (B): O tratamento da rede perineuronal com condroitinase degrada todas as cadeias de condroitin sulfato (linhas vermelhas) assim como as cadeias de HA (linhas rosa). Esta degradação leva a uma total desestruturação das interações heterofílicas que mantêm a estabilidade da rede perineuronal. Além disso, esta desestruturação poderia permitir o crescimento axonal, assim como as interações entre neurônios vizinhos, contribuindo para uma modificação na plasticidade neuronal e na capacidade migratória em eventos patológicos como o câncer (FOX e CATERSON, 2002).

Entre os astrócitos, pericitos e células endoteliais encontram-se os elementos de MEC da membrana basal. Essa estrutura tem um papel fundamental na organização da barreira hematoencefálica, serve de sítio de ancoragem, influencia no metabolismo celular, pode induzir a diferenciação, fornece substrato para a migração celular e funciona como uma barreira física para a passagem de macromoléculas. Ultraestruturalmente a lâmina basal apresenta duas camadas distintas, a *lamina lucida ou rara*, que se apresenta adjacente à membrana plasmática da célula onde repousa, e a *lamina densa*. Uma terceira camada contendo fibrilas colágenas, a *lamina fibroreticularis*, também pode ser encontrada próxima à lâmina basal o que torna a estrutura visível inclusive à microscopia de luz.

Convém ressaltar que alguns biólogos e histólogos denominam essas três camadas de membrana basal; outros, por sua vez, usam os termos lamina basal e membrana basal sem uma distinção aparente.

A arquitetura molecular da membrana basal (Figura 8) é constituída por glicoproteínas e proteoglicanos permeados em duas grandes redes moleculares, uma formada pelo colágeno tipo IV e a outra formada por LN. Contudo, a exata composição da membrana basal no SNC ainda é foco de estudo. Sabe-se que, além das redes de colágeno tipo IV e LN, também é possível encontrar-se outras moléculas típicas de membrana basal no SNC, tais como: entactina/nidogênio, FN, SPARC, fibulina-1 e perlecan (um proteoglicano heparan sulfato). Até mesmo a presença de proteoglicanos condroitin sulfato foi evidenciada nas membranas basais do SNC (STICHEL e MÜLLER, 1998).

A **Laminina (LN)** é uma proteína multidomínios e a sua diversidade é decorrente da existência de três cadeias polipeptídicas homólogas (α , β e γ), porém distintas, que unidas formam diferentes isoformas triméricas (figura 9). Além disso, existem diferentes variantes das cadeias polipeptídicas α , β e γ que são o resultado tanto do "splicing" alternativo, quanto de processos proteolíticos pós-transcricionais (TUNGGAL et al., 2000). Assim como outros elementos de MEC, as expressões das diferentes isoformas de LN apresentam um controle temporal e espacial durante os processos de morfogênese. No cérebro a LN é expressa em doses muito baixas sendo encontrada preponderantemente nas membranas basais dos vasos. No sistema nervoso essas glicoproteínas são produzidas por células de Schwann, pela glia olfatório-limitante, pela astroglia e por neurônios.

Apenas recentemente foi descoberta uma relativa diversidade de LNs no cérebro adulto e foram encontradas pelo menos 5 tipos diferentes de cadeias de LNs o que sugere a existência de diversas variantes, cuja presença poderia estar relacionada com uma diversidade funcional e estrutural das membranas basais.

Figura 8: Modelo estrutural da lâmina basal. **(A)** A lâmina basal é formada por interações específicas entre o colágeno tipo IV, a laminina e a entactina, além de proteoglicanos heparan sulfato como o perlecan. **(B)** Diagrama da natureza das interações entre os componentes da lâmina basal. **(C)** A membrana basal no contexto da barreira hematoencefálica. A imagem evidencia um capilar sanguíneo recoberto por porcessos astrocíticos e a membrana basal interposta entre estes dois tipos celulares. Imagem adaptada de ALBERTS et al. (1994).

Figura 9: Estrutura generalizada da molécula laminina. A representação evidencia as três cadeias polipeptídicas que constituem a molécula de laminina assim como os domínios de ligação com diferentes elementos de MEC, estruturas celulares e metabólitos.

Figura 10: Representação esquemática da molécula de fibronectina. (a) Domínio de ligação com heparina e fibrina. (b) Domínio de ligação com o colágeno. (c) Domínio de ligação com a fibrina. (d) Domínio de ligação com a célula (observe a presença do tripeptídeo RGD e a sua conformação espacial). (e) Sítio de ligação com a heparina. (f) Sítio de ligação com fibrina.

Convém lembrar que, juntamente com as células endoteliais e os prolongamentos astrocíticos, a membrana basal dos vasos do SNC apresenta um papel peculiar na manutenção da barreira hematoencefálica. Villanova et al. (1997) evidenciaram a presença das cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ na membrana basal dos vasos tanto no SNC quanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP). Hagg et al. (1997) identificaram a imunomarcagem da cadeia $\gamma 1$ da LN em praticamente todos os corpos neuronais e processos proximais do SNC adulto. Outros trabalhos evidenciaram ainda que a imunoreatividade da cadeia α -2 de LN no cérebro adulto está associada com as fibras neuronais potencialmente sinápticas e estruturas das regiões límbicas do cérebro. Diferentes receptores de superfície neuronais têm sido identificados para a LN-1 entre os quais podemos citar diversos membros da família das integrinas, além de receptores não integrina-dependentes como o LBP-100, o receptor para LN de 67 kDa, o α -dystroglican e a beta-1,4-galactosiltransferase. Apesar disso, pouco se sabe sobre os ligantes específicos das outras isoformas de LN (NOVAK e KAYE, 2000; POWELL e KLEINMAN, 1997; JUCKER et al., 1996; TOTI et al., 1998; HAGG et al., 1997; VILLANOVA et al., 1997).

A **fibronectina (FN)** é outra glicoproteína adesiva com diversos domínios de ligação em sua estrutura. Estes domínios são responsáveis pela interação da FN com diferentes receptores da superfície celular, assim como com outros elementos de MEC. Sua estrutura é dimérica e unida por pontes dissulfeto próximas à região carboxil das cadeias. Cada monômero da FN apresenta domínios funcionalmente distintos e separados por regiões flexíveis da cadeia polipeptídica. Os domínios consistem de pequenos módulos serialmente repetidos e codificados por exons específicos. Este fato sugere que o gene da FN, assim como os genes dos colágenos, envolve múltiplas duplicações de exons. Cada cadeia da FN consiste de três tipos de unidades repetidas (chamadas repetições fibronectina): a tipo I, a tipo II e a tipo III. A FN contém 12 repetições tipo I, 2 repetições tipo II e entre 15 e 17 repetições tipo III que juntas equivalem a quase 90% da sequência da molécula. Embora seja produto de um único gene, a FN pode existir sob múltiplas isoformas decorrentes de “splicing” alternativo, gerando mais de 20 variantes apenas no ser humano. A FN apresenta domínios de ligação para o colágeno, heparina e para vários receptores celulares. A presença da sequência peptídica RGD (arginina-glicina-aspartato) permite a ligação da FN à receptores de superfície celular como, por exemplo, as integrinas (Figura 10 – página 34). Contudo, o reconhecimento dessa sequência tripeptídica é complexo e depende da sua apresentação tridimensional e das características dos sítios de ligação com as integrinas. A integrina clássica de ligação com a FN é a $\alpha_5\beta_1$ que se liga às repetições III₉ – III₁₀, mas

essa integrina pode também interagir com o fragmento N-terminal da FN nas repetições I₁₋₉ e II_{1,2}; um fato interessante é que os sinais mediados pela ligação com a integrina nesses dois casos são distintos. Algumas variantes da FN apresentam ainda seqüências capazes de interagir com as integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ e $\alpha_9\beta_1$ (PANKOV e YAMADA, 2002).

A FN apresenta dois domínios heparina, que são responsáveis pela interação com proteoglicanos heparan sulfato, e domínios de ligação com o colágeno. Estes últimos parecem estar mais relacionados com a ligação com o colágeno desnaturado artificialmente (gelatina) do que com o colágeno nativo, porém, análises recentes mostram que a tripla hélice de colágeno pode estar desnaturada sob certas condições *in vivo* o que sugere uma provável interação com a FN (ALBERTS et al., 1994a; PANKOV e YAMADA, 2002).

A relevância da expressão de FN no cérebro adulto ainda é incerta embora tal glicoproteína seja requerida durante o desenvolvimento do SNC. No cérebro normal a FN é pouquíssimo expressa e restringe-se às membranas basais dos vasos e a limitante externa da glia. Poucos estudos se atêm ao papel da FN no tecido nervoso normal, entretanto diversos trabalhos evidenciam uma produção aumentada de FN em tumores cerebrais (a expressão destes elementos de MEC em tumores será abordada posteriormente).

Outros elementos de MEC presentes nas membranas basais associadas aos vasos cerebrais são os colágenos. Já foram descritos pelo menos 30 produtos gênicos distintos capazes de originar uma grande diversidade de tipos de colágenos. Os colágenos são encontrados preponderantemente fora das células. Eles apresentam repetições do tipo Gly-X-Y e sofrem modificações pós-transcricionais significativas; a ligação cruzada de suas cadeias forma as fibras colágenas que são estruturas insolúveis. Em geral os colágenos apresentam estruturas helicoidais, formadas pela interação de três cadeias polipeptídicas, contudo, as cadeias de colágeno IV, VIII e X interagem diferentemente formando uma rede flexível (figura 9).

No SNC os colágenos se restringem basicamente às membranas basais (colágeno IV e V), mas podem ser encontrados também na limitante externa da glia, que recobre a superfície cerebral e representa o limite externo do encéfalo (colágenos I, III, IV). Justamente por apresentar uma baixa concentração de colágenos fibrilares o cérebro apresenta uma consistência menos rígida do que outros órgãos sistêmicos (NOVAK e KAYE, 2000; BELLAIL et al., 2004; PAULUS et al., 1994).

1.2 Cicatriz glial: uma profunda reestruturação da MEC do SNC

A astroglia apresenta inúmeras funções no SNC entre elas: suporte e direcionamento da migração dos neurônios durante o desenvolvimento, controle da homeostase iônica, captação de neurotransmissores, contribuição para o sistema imune do SNC e neuromodulação. Outro papel das células astrogliais é a preservação da integridade do tecido nervoso após uma lesão. Este papel é desempenhado por astrócitos ativados, também conhecidos como astrócitos reativos. Esta reação histopatológica foi primeiramente observada em 1928 por Ramón y Cajal que postulou que este evento também estava associado com uma falha, ou uma inibição, do crescimento axonal pós-lesão. O processo de gliose reativa, que resulta na formação da cicatriz glial, é caracterizado pela hipertrofia dos astrócitos e pela proliferação destes e de células microgliais (RIDET et al., 1997).

A gliose reativa tem, entre outras funções, o papel de inibir a mielinização e o crescimento axonal desgovernados coibindo assim a formação de sinapses indesejadas, contudo, sob certas condições, os astrócitos reativos podem também tornar o substrato circundante permissível à extensão dos neuritos. Sugere-se que essa natureza inibitória da cicatriz glial é decorrente tanto do acúmulo de inibidores de crescimento axonal (formando uma barreira molecular), quanto da formação de uma matriz extracelular densa e impenetrável (barreira física) na região da lesão. Assim, a formação da cicatriz glial criaria uma barreira física ao redor da lesão capaz de isolar o tecido ainda intacto de lesões secundárias (RIDET et al., 1997). Tanto a presença de um tumor cerebral, quanto os procedimentos cirúrgicos para sua retirada, podem levar à indução de uma cicatriz glial. Por esse motivo o estudo e compreensão dos processos envolvidos em sua formação são importantes para diferentes ramos da neuropatologia.

Existem diferentes tipos de células (endoteliais, gliais e do sistema imune) e sinais celulares envolvidos na formação da cicatriz glial. Durante as primeiras horas após a lesão, células neuronais e gliais entram em morte na região lesada e há um concomitante recrutamento de (1) células microgliais e de monócitos provenientes da corrente sangüínea (incluindo macrófagos), (2) células leptomeníngeas, que são em geral encontradas na superfície do SNC e (3) de fibroblastos, que migram para a região da cicatrização influenciando na reestruturação da lamina basal (MCGRAW et al., 2001; FAWCETT e ASHER, 1999, CARBONELL e BOYA, 1988). Uma descoberta surpreendente dos últimos

anos mostra que no SNC normal também apresenta uma rede de células com o proteoglicano NG-2 ou o receptor de PDGF- α (platelet-derived growth factor) em suas superfícies, estas células são muito provavelmente precursoras de oligodendrócitos e, aparentemente, são recrutadas para as regiões não mielinizadas da lesão. Um fato interessante é que o NG-2 (um proteoglicano condroitin sulfato) também pode inibir o crescimento axonal. Além disso, células progenitoras nestina-positivas se diferenciam para astrócitos na região lesada, entretanto o papel dessas células na formação da cicatriz glial ainda é incerto (FRISEN et al., 1995). Dentro de 3-5 dias após a lesão os astrócitos reativos iniciam um processo de isolamento da região lesada e passam a expressar maiores quantidades de uma proteína estrutural, a GFAP (proteína acídica fibrilar glial). Esses astrócitos migram do parênquima adjacente não lesado (através do tecido lesado) e finalmente emitem seus processos astrocíticos gerando um plexo denso, ou uma “barreira” de células astrogliais. Essas redes de astrócitos mantêm uma íntima relação física e química mediada por junções oclusivas e junções comunicantes. A formação da barreira de células astrogliais é considerada o último evento da gliose reativa e recebe o nome de astrogliose anisomórfica. Os eventos transicionais do processo de gliose reativa, e que precedem a formação da cicatriz glial propriamente dita, recebem o nome de astrogliose isomórfica (MCGRAW et al., 2001).

Enquanto a superexpressão de GFAP é considerada o evento mais global e nítido nos astrócitos reativos, várias outras moléculas foram identificadas como tendo suas expressões alteradas durante a formação da cicatriz glial. Notavelmente, muitas dessas moléculas só apresentam sua expressão regulada positivamente durante o desenvolvimento. Além disso, a resposta dos astrócitos reativos é muito heterogênea e depende da natureza da lesão, da proximidade dos astrócitos ao sítio da lesão e mesmo do microambiente onde ocorre a lesão. Os astrócitos proximais à lesão apresentam uma expressão aumentada de nestina e vimentina, além de uma gama de outras alterações bioquímicas tais como: a produção de fatores tróficos, de citocinas, de proteases, de inibidores de proteases, de elementos de matriz, entre outros (FAWCETT e ASHER, 1999).

Juntamente com a ação de fatores séricos exudados os astrócitos reativos conduzem a uma notável alteração histopatológica dentro da região da cicatriz glial: uma mudança profunda na composição da MEC local (STICHEL e MÜLLER, 1998).

Dentre os elementos de MEC encontrados na região da lesão os mais proeminentes são aqueles que constituem a membrana basal (LN, colágenos III e IV, entactina/nidogênio, FN, SPARC, fibulina-1, perlecan e proteoglicanos condroitin sulfato). Um fato interessante é

que durante o processo de cicatrização os depósitos de membrana basal tornam-se mais densos ao redor dos vasos, chegando inclusive a cobrir parcialmente os prolongamentos astrocíticos. Além disso, a membrana basal é uma estrutura que apresenta propriedades contráteis, o que aproxima as margens da lesão e viabiliza uma cicatrização eficiente (MCGRAW et al., 2001; STICHEL e MÜLLER, 1998).

As expressões das cadeias $\beta 1$ e $\beta 2$ da LN foram identificadas imunohistoquimicamente nas áreas de gliose após a lesão cortical. Contudo os tipos celulares responsáveis pela síntese dessa LN, e de outros elementos da membrana basal, ainda não foram elucidados. Dois candidatos são os astrócitos reativos e as células endoteliais, ambos capazes de produzir a LN-1. Por outro lado, os astrócitos reativos não são capazes de sintetizar colágeno IV, o que sugere que esses tipos celulares não estão envolvidos na síntese da membrana basal da região da cicatriz glial. No entanto, Liesi e Kauppila (2002) mostraram que astrócitos maduros da medula espinhal podem ser induzidos a produzir colágeno IV quando sob influência da interleucina-1 β e do fator de transformação tumoral $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Outros estudos mostraram que após o neurotrauma a expressão de RNAm de TGF- $\beta 1$ e dos seus receptores colocaliza-se com a microglia e injeções desse modulador em regiões lesionadas amplifica a resposta astrogliótica (MCKEON et al., 1995; LIESI e KAUPPILA, 2002; MCGRAW et al., 2001).

Outra molécula que apresentou a expressão de seu RNAm aumentada durante a astrogliose foi o proteoglicano condroitin sulfato brevican e na cicatriz glial apenas a forma secretada apresenta sua expressão aumentada. Além disso, a localização celular dos transcritos de brevican foi consistentemente relacionada aos grupos de astrócitos reativos. A expressão da forma secretada do brevican, que também é regulada durante o desenvolvimento, sugere um papel na ligação com o HA durante a gliose, o que poderia ser um elemento crítico no controle dos mecanismos gliais (moleculares e celulares) de proliferação, diferenciação e migração. É importante lembrar que a extensão dos processos astrocíticos durante a resposta gliótica prediz uma reorganização dos elementos do citoesqueleto da célula, assim como dos elementos da MEC. Neste aspecto o HA, que também apresenta sua expressão aumentada na região da lesão, serve como um substrato altamente permissível e regulador da migração celular. Outro fato interessante, ressaltado por Jaworski e colaboradores (1999), é que o aumento da expressão de brevican em ratos deu-se num período restrito da formação da cicatriz glial, período esse que condiz com o momento em que as células gliais estão em plena migração. Realmente, o pico de proliferação dos astrócitos ocorre entre 3 e 4 dias após a lesão e o brevican foi expresso a

partir do 4º dia após a lesão (com um pico no 7º dia). Thon e colaboradores (2000) evidenciaram esse fato através da análise do comportamento migratório dos astrócitos após a lesão entorinal do córtex, isto é, a desnervação de regiões cerebrais específicas. Nesse procedimento a gliose ocorre na camada molecular da *fascia dentata* desnervada e é possível observar-se a migração dos astrócitos para a zona desnervada num padrão específico, i.e, camada-dependente. A comparação da expressão de brevican entre as células migratórias e as não-migratórias das camadas da *fascia dentata* de ratos, mostrou que a motilidade astrogliar induzida pela lesão estava diretamente associada com um aumento na expressão de brevican (JAWORSKI et al., 1999; THON et al., 2000).

Assim como o brevican, o neurocan também apresenta a sua expressão aumentada após lesões ao SNC. Este proteoglicano é um dos maiores inibidores da regeneração axonal e sua atividade é decorrente da sua interação com moléculas de adesão neuronal (N-CAM e Ng-CAM/L1), TAG-1/axonin-1 e TN. Um fato intrigante é que o neurocan produzido por astrócitos apenas apresenta um papel inibitório quando retido entre as células astrocíticas numa conformação tridimensional. Esse fato sugere que as células astrocíticas que o produzem liberam-no para a matriz extracelular onde ele é “aprisionado” por outros elementos de MEC. A produção de neurocan é regulada positivamente por TGF- β , TGF- α e EGF e regulada negativamente por PDGF (FAWCETT e ASHER, 1999). Outras moléculas como o versican, o biglican e o decorin também apresentaram uma expressão alterada em lesões do SNC.

Os astrócitos reativos expressam também moléculas potencialmente inibidoras do crescimento axonal, como a TN-C, os proteoglicanos condroitin sulfato e os proteoglicanos heparan sulfato. Stichel e colaboradores evidenciaram que os axônios foram capazes de alongar-se através do denso tecido astrogliótico, assim como nas áreas peri-lesionais ricas em proteoglicanos. Esse fato sugere que os astrócitos reativos e seus produtos não seriam uma barreira impenetrável ao crescimento axonal. A membrana basal, por sua vez, apresenta-se como um forte candidato à inibição da regeneração axonal, pois além de ser uma barreira mecânica pode armazenar diversos moduladores de crescimento (STICHEL e MÜLLER, 1998; STICHEL e MÜLLER, 1994; STICHEL et al., 1995; MCKEON et al., 1995).

Como já citado, outra molécula que apresenta sua expressão aumentada na cicatriz glial é a TN-R. Tal expressão sugere uma contribuição na inibição do crescimento axonal, assim como um papel na formação da cicatriz glial. A distribuição espacial e temporal da TN-R após a lesão assemelha-se muito àquela encontrada para a TN-C e para os proteoglicanos condroitin sulfato. Além disso, a super-expressão de TN-R após a lesão do

SNC provavelmente envolve a ação do PDGF, que é produzido por plaquetas ativadas e astrócitos, assim como a regulação autócrina dos oligodendrócitos (PESHEVA e PROBSTMEIER, 2000).

Além dos astrócitos reativos, a microglia e os endoteliócitos exercem um papel fundamental na formação da cicatriz glial. Essas células são ativadas rapidamente após a lesão e sofrem profundas alterações em seu fenótipo. A forma fagocitária da microglia é responsável pela produção de citocinas, lipídios bioativos, fatores de coagulação e fatores neurotróficos. As células endoteliais, por sua vez, são estimuladas por diferentes fatores angiogênicos e passam a se dividir, migrar e depositar elementos de matriz. Depois da lesão a média de capilares na região é quase o dobro do inicial e esses novos vasos apresentam uma área luminal total muito aumentada, assim como uma deposição de lâmina basal proeminente. O aumento da vascularização provê suportes nutricionais, tróficos e metabólicos essenciais ao processo de cicatrização (STICHEL e MÜLLER, 1998).

1.3 Caracterização, classificação e aspectos clínicos dos gliomas

As neoplasias do SNC são responsáveis por aproximadamente 2% das mortes relacionadas ao câncer. Dentre os diferentes tipos de tumores cerebrais os meduloblastomas do cerebelo e os gliomas são os mais estudados. As células da glia são as precursoras dos gliomas que podem ter uma origem astrocítica, oligodendrocítica ou mista (oligoastrocitomas). Os gliomas de origem astrocítica (astrocitomas) são os mais freqüentes correspondendo a 40% de todas as neoplasias do SNC. Convém ressaltar que ainda existem muitas discussões acerca das células de origem dos gliomas astrocíticos. Os gliomas mais malignos apresentam tanto células mais diferenciadas e de real origem astrocítica quanto células precursoras sugerindo que estes tumores poderiam ser na verdade astroblastomas. A incidência dos gliomas apresenta dois picos etários significativos, um durante a infância (entre 6 e 10 anos) e outro na fase adulta (45 e 65 anos). Aparentemente a ocorrência de gliomas não apresenta relação com fatores epidemiológicos (KETTEMAN e RANSON, 1995; LOUIS et al., 2002).

De acordo com a World Health Organization (WHO), os astrocitomas podem ser divididos em astrocitomas de baixo grau anaplásico, astrocitomas anaplásicos e glioblastomas multiformes (GBM), e são atualmente classificados quanto ao seu grau de malignidade de I a IV. O glioblastoma multiforme (grau WHO = IV) é o mais maligno e mais freqüente dos gliomas astrocíticos e apresenta uma maior incidência em adultos (LOUIS et

al., 2002, LOUIS et al., 2001). Suas principais características são: hipercelularidade, alto pleomorfismo, grande atividade mitótica, focos de necrose, extensa proliferação endotelial, altíssima invasibilidade nas estruturas cerebrais e uma baixa capacidade de realizar metástases fora do SNC (0,1 a 0,5%). Os GBMs são formados por dois grandes grupos, os GBMs secundários e os primários; os GBMs secundários são originários de um astrocitoma de baixo grau de anaplasia e apresentam uma mutação no gene *TP53*; já os GBMs primários, também chamados de GBMs "de novo", surgem subitamente e apresentam uma amplificação no gene do *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidermal), estes últimos incidem sobre pacientes mais idosos e são pouquíssimo responsivos às terapias anti-neoplásicas convencionais (LOUIS et al., 2002).

Os principais tratamentos de gliomas consistem da retirada cirúrgica (quando possível) e radiocirurgia estereotáxica seguidas de tratamentos radioterápicos e quimioterápicos. Em geral os quimioterápicos apresentam alguns efeitos positivos no controle dos astrocitomas de baixo e médio grau de anaplasia; no entanto, os GBMs são fortemente resistentes à quimioterapia convencional (Vincristina, Carmustina, Etoposida e Temozolamida) assim como à radioterapia. Segundo a WHO apenas 10% dos GBMs apresentam alguma responsividade às terapias convencionais. A média de sobrevida dos pacientes portadores de gliomas dependerá de fatores biológicos e terapêuticos como a idade, o subtipo tumoral, o grau de anaplasia e a sensibilidade à quimio/radioterapia. Pacientes com GBM apresentam, em geral, uma sobrevida entre 6 e 12 meses pós-cirurgia. Já pacientes com astrocitomas anaplásicos apresentam uma sobrevida de dois anos em 72% dos casos (DELATTRE e UCHUYA, 1996; GALANIS e BUCKNER, 2000).

Os gliomas freqüentemente apresentam uma heterogeneidade celular que é refletida no seu crescimento e na sua ampla disseminação pelo SNC. Diversas variações celulares são encontradas nas grandes classes de gliomas assim como em tumores individuais. Os tumores infiltram-se difusamente no cérebro normal tornando a retirada cirúrgica total praticamente impossível e a radioterapia local muito dificultada. As células tumorais infiltrativas tendem a migrar por estruturas anatômicas e por interfaces estruturais do cérebro como as fibras mielinizadas (do corpo caloso, da cápsula interna, do fórnix, da comissura anterior e da radiação óptica), além das meninges, dos contornos dos ventrículos e de regiões perivasculares (RUSSEL e RUBISTEIN, 1989; KLEIHUES et al., 1995). Esses diferentes sítios de dispersão conduzem à existência de GBMs multifocais, por outro lado os gliomas raramente realizam metástases fora do SNC. Uma provável explicação para esse fato é que as leptomeninges poderiam constituir uma barreira à dispersão celular

(PEDERSEN et al., 1994). Além disso, o tempo curto de sobrevida dos pacientes também poderia limitar a dispersão das células tumorais pelo neuro-eixo. A disseminação das células tumorais dentro do cérebro pode dar-se por duas vias, (1) por fluxo passivo pelo fluido cérebro-espinhal do espaço perivascular ou (2) por migração ativa, mediada por receptores celulares, ao longo dos limites ventriculares (TYSNES e MAHESPARAN, 2001).

A classificação dos gliomas usada pelo WHO foi derivada das análises histológicas realizadas por Bailey e Cushing durante a década de 1920. Esses pesquisadores traçaram paralelos entre a morfologia dos tumores gliais e de diferentes estágios da glia em desenvolvimento. Muitos trabalhos sugerem que esta classificação ainda é imprecisa, dado que a análise dos cortes pelos patologistas ainda apresenta uma certa subjetividade. Desta forma, diversas pesquisas se atêm em análises de expressão gênica diferencial em tumores gliais com o intuito de aprimorar o sistema classificatório atual (LOUIS et al., 2001). Contudo, histologicamente os GBMs apresentam características muito peculiares que, aliadas às informações macroscópicas obtidas por ressonância magnética e/ou tomografia, podem levar a um diagnóstico preciso da doença. Infelizmente, os tratamentos atualmente utilizados não têm como mote a cura do paciente e sim o aumento de sua sobrevida e, aliado a isso, o campo de estudo das bases moleculares dos processos invasivos e migratórios desses tumores ainda é incipiente quando comparado às neoplasias mais freqüentes como as mamárias e prostáticas.

1.4 Alguns aspectos do processo migratório dos gliomas

A migração de uma célula é incontestavelmente um processo dinâmico e que envolve múltiplos passos biológicos. Dessa forma, o estudo de modelos tumorais altamente invasivos pode elucidar, ao menos em parte, algumas das escolhas bioquímicas da célula migrante trazendo à tona perspectivas de novos alvos terapêuticos moleculares. Segundo Liotta (1986) o processo migratório envolve no mínimo três etapas que apesar de independentes são altamente coordenadas: (1) a adesão celular aos elementos de matriz extracelular–MEC, (2) a motilidade celular *per se*, que envolve a reorganização do citoesqueleto e a plethora de modificações nas interações entre receptores de superfície e a MEC e (3) a invasão, onde ocorre a remodelação da MEC circundante por enzimas proteolíticas, principalmente proteases serina, que são secretadas pelo tumor ou por células ativadas por ele (LIOTTA, 1986).

Nesse contexto é premente a caracterização do processo migratório de tumores astrocíticos, em especial do GBM cuja alta taxa de reincidência pós-cirúrgica é decorrente da infiltração difusa do tumor no tecido normal adjacente. O ambiente molecular peculiar que constitui o parênquima cerebral, caracteristicamente pobre em elementos de matriz fibrilares, pode ainda sugerir as “reais necessidades bioquímicas” de uma célula tumoral migrante. De fato, muitos trabalhos mostram que células de GBM são eficientes na síntese de seus próprios componentes de matriz extracelular ou ainda aderem e migram por matrizes mais permissíveis em estruturas como, por exemplo, os vasos cerebrais e tumorais (PILKINGTON, 1996). Assim, as informações sobre o evento migratório de glioma poderiam esclarecer também os mecanismos da migração de outros tipos tumorais.

Contudo, dado o infinto número de eventos paralelos que acontecem durante a migração de uma célula, torna-se difícil a apresentação do processo como um todo de uma forma linear. Acrescido a isso, dentro do modelo aqui estudado há uma interação íntima entre os fenômenos migratórios, proliferativos e angiogênicos tumorais. Assim, optou-se por apresentar o processo migratório em diferentes tópicos relevantes dentro do contexto dos gliomas. Esta parte da introdução foi dividida em 4 grandes blocos: O SUBSTRATO, A ADESÃO, A INVASÃO E A ANGIOGÊNESE. Em alguns momentos será necessário remetermo-nos às moléculas citadas anteriormente ou ainda introduzir assuntos que serão retomados profundamente *a posteriori*.

1.4.1 O substrato

1.4.1.1 A membrana basal e o seu papel na migração de células de glioma

A MEC exerce um papel essencial na diferenciação, sobrevivência, proliferação, adesão e motilidade celular (GLADSON, 1999; BELOT et al., 2001; BELLAIL et al., 2004). Nas análises histopatológicas rotineiras, elementos de MEC não eram facilmente identificados adjacentes às células de glioma, mas durante as décadas de 70 e 80 diversos trabalhos evidenciaram a produção de elementos de matriz por linhagens humanas de gliomas. Foi apenas em 1998 que Rutka e colaboradores sugeriram o incontestável papel da MEC no comportamento maligno dos gliomas humanos (RUTKA et al., 1988; MCKEEVER et al., 1986; ALITALO et al., 1983; RABSON et al., 1977; NEDERMAN et al., 1984).

As células de glioma podem prover o ambiente com um substrato mais permissivo às suas necessidades, sintetizando e depositando elementos de MEC pró-adesivos, tais como colágenos, lamininas, glicoproteínas adesivas e proteoglicanas além de substratos anti-adesivos como a TN-C, trombospondina-1 e SPARC (LEFRANC et al., 2005; GOLDBRUNNER, 1998). Muitos desses componentes de matriz são mais expressos em tumores de alto grau em comparação com os gliomas de graus mais baixos o que permite, em alguns casos, predizer o prognóstico do paciente (BELOT et al., 2001). Essa síntese de MEC pelas células tumorais acaba por compensar a pobreza de substratos permissivos à migração no parênquima do cérebro normal adulto.

No cérebro adulto, a LN, a FN e o colágeno IV são os principais componentes das membranas basais associadas à glia limitante externa (membrana basal subpial), às células epiteliais do plexo coróide e às células endoteliais vasculares. Nos capilares cerebrais normais as células endoteliais estão recobertas com uma delgada camada de membrana basal, onde se apóiam os pés-vasculares astrogliais. Todavia, nas arteríolas a membrana basal divide-se e passa a apresentar um componente associado às células endoteliais, e outro associado aos prolongamentos astrocíticos, que constituem os pés-vasculares. É justamente no espaço peri-vascular (ou espaço Virchow-Robin), entre as duas membranas basais, onde ocorre a migração das células de glioma (vide Figura 11). Tais células tumorais podem migrar passivamente (carregadas pelo líquido cérebro-espinhal que flui no espaço peri-vascular) ou ativamente através da interação com os elementos de MEC das membranas basais ou com os elementos de MEC produzidos por elas próprias (KNOTT et al., 1998; PAULUS e TONN, 1994).

Um outro aspecto relevante da migração de gliomas é o fato desses tumores não invadirem a membrana basal produzida pelos endoteliócitos. Por certo tempo sugeriu-se que os gliomas não eram capazes de degradar os elementos de matriz constituintes da membrana basal; esse conceito caiu por terra no momento em que se evidenciou a freqüente disseminação e invasão de células de gliomas humanos pela membrana basal subpial e pelas leptomeninges. Contudo, trabalhos *in vitro* e *in vivo* mostram categoricamente que as células de gliomas apresentam a habilidade de invadir elementos de membrana basal, mas não são capazes de degradar as membranas basais sintetizadas pelos endoteliócitos, pois utilizam tais elementos de matriz como substrato de adesão, ou “trilhos”, para a sua migração (KNOTT et al., 1998; PAULUS e TONN, 1994; GOLDBRUNNER, 1998; GIESE et al., 1994; PAULUS et al., 1988).

Figura 11: Representação esquemática das possíveis interações entre as células de glioma e os vasos sanguíneos do cérebro normal. Os componentes da membrana basal são produzidos durante a proliferação das células endoteliais e no processo neoangiogênico. Essa membrana basal se fende na altura das arteríolas criando o espaço perivascular, onde se associam os pés-vasculares dos astrócitos. (adaptação de imagem de KNOTT et al., 1998).

Em um estudo imunohistoquímico de seis casos de GBM pediátrico, Caffo et al. (2004) mostraram as expressões de constituintes das membranas basais (LN, FN e colágeno IV) associadas aos vasos hiperplásicos, às paredes vasculares, ao espaço perivascular e às áreas de proliferação endotelial em todos os tumores (CAFFO et al., 2004).

Usando o método de expressão gênica (gene array) combinado com RT-PCR e imunohistoquímica, Ljubimova et al. (2001) mostraram pela primeira vez que GBMs expressam muito a cadeia $\alpha 4$ de LN em tumores de alto e baixo grau de malignidade; os autores evidenciaram ainda a expressão dessa cadeia de LN no tecido histologicamente normal adjacente ao GBM (LJUBIMOVA et al., 2001). Em outro trabalho os autores observaram a presença de LN-8 nesse mesmo sítio. Esses dados sugerem fortemente um papel da LN na recidiva da neoplasia, facilitando a dispersão das células infiltradas que não foram retiradas cirurgicamente (LJUBIMOVA et al., 2004). Além disso, sabe-se que a LN-8 e seus receptores, as integrinas $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$, são importantes na homeostase das membranas basais dos vasos cerebrais e na angiogênese *in vitro* e *in vivo* (GONZALEZ et al., 2002). Análises imunohistoquímicas em GBMs humanos evidenciaram a expressão de LN-5 difusamente em seu parênquima, ao contrário de outras LNs que são expressas nas paredes dos vasos (FUKUSHIMA et al., 1998). A LN-1, por sua vez, é capaz de induzir a migração de células de biópsias de gliomas humanos, enquanto a LN-2 apresentou-se como um substrato muito eficiente para a adesão e migração de linhagens de glioma *in vitro* (GIESE et al., 1995).

Uma característica da molécula de LN é a presença de sítios críticos que interagem com os receptores celulares após a clivagem da molécula por proteases. Em geral nos tumores e no tecido normal que o originou a expressão de LN é similar, contudo, a expressão dos receptores de LN entre as células normais e tumorais difere. Um dos principais mecanismos de contribuição da LN para o fenótipo maligno é a indução da proliferação celular. Os mais de 20 diferentes peptídeos originados da clivagem da molécula de LN apresentam diversas propriedades neoplásicas como, por exemplo, indução da migração e angiogênese. Além disso, alguns tumores metastáticos apresentam um aumento da expressão de metaloprotease de matriz 2 (MMP-2) quando na presença de LN-1 (GIVANT-HORWITZ, 2004).

Clubb e Shivers (1996) mostraram que em células de glioma de rato C6, diversos componentes de membrana basal, como a LN, o colágeno IV o Matrigel®, eram capazes de induzir a organização do citoesqueleto das células de uma forma substrato-dependente.

Diferentes trabalhos até então mostravam que linhagens tumorais apresentavam uma organização pequena de seus filamentos de actina, principalmente no que concerne à formação de fibras de estresse. Esta desorganização seria decorrente de uma perda da conexão substrato-citosqueleto dessas células. O trabalho de Clubb e Shivers mostrou que, apesar de simplificada, há uma organização diferenciada dos filamentos de actina das células, o que foi refletido também pela presença de vinculina, proteína ligante de actina associada à superfície citoplasmática da membrana, nas placas de adesão (CLUBB e SHIVERS, 1996).

Um outro constituinte da membrana basal dos vasos, e que apresenta um papel indiscutível no metabolismo migratório de gliomas, é a FN. Em 1978 Schachner et al. reportaram a sua presença em tumores cerebrais e sua ausência nos neurônios, nas células gliais normais e nas células gliais tumorais (SCHACHNER et al., 1978).

A observação da produção de FN por células de glioma remonta ao final da década de 1970 e ao início de 1980 quando Mckeever et al. (1986), Halfter et al. (1989), entre outros, evidenciaram que células C6 de glioma de rato, cultivos primários de gliomas humanos e astrócitos normais eram capazes de produzi-la *in vitro*. Anos depois, Chintala et al. (1996) e outros grupos de pesquisas mostraram que a FN, bem como a LN e o colágeno IV, estavam associadas à matrizes extracelulares e às células tumorais de GBMs (MCKEEVER et al., 1986; HALFTER et al., 1989; CHINTALA et al., 1996a; PLANCHENAULT et al., 2001; BOUTERFA et al., 1999).

A FN apresenta diversas isoformas resultantes do “splicing” alternativo de três diferentes regiões do RNAm (ED-A, ED-B e IIICS). As regiões ED-A e ED-B são excluídas do RNAm maduro e são praticamente indetectáveis nos tecidos normais adultos. Contudo, em tecidos fetais e neoplásicos tais isoformas podem ser detectadas. De fato, Chintala et al. (1996a) mostraram que gliomas malignos (GBMs e Astrocitomas anaplásicos) expressam isoformas de FN que contêm essas duas seqüências. Pela técnica de hibridização *in situ*, Castellani et al. (2002) identificaram que a isoforma ED-B (ou B-FN) foi expressa pelos vasos tumorais, mas não pelos vasos normais de astrocitomas humanos de baixo e alto grau, o que sugere um papel da B-FN na angiogênese tumoral. Corroborando essa hipótese, estudos mostraram que a FN foi capaz de induzir a formação de novos vasos sendo a primeira proteína depositada na MEC das células endoteliais tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os autores mostraram ainda que a expressão de B-FN pôde ser usada como um

marcador da diferenciação entre astrocitomas de baixo grau, astrocitomas de alto grau e o tecido normal (CHINTALA et al., 1996A; CASTELLANI et al., 2002).

Uma MEC rica em FN pode induzir a proliferação e migração de células endoteliais, mas não participa da formação dos vasos e de sua maturação. A expressão das isoformas que contêm as seqüências ED-A e ED-B pode estimular a migração de células de glioma muito mais fortemente do que isoformas desprovidas dessas seqüências. Assim, a expressão dessas isoformas pela vasculatura do tumor poderia ser um fator de “atração” para as células tumorais. No cérebro normal a FN está restrita às membranas basais dos vasos e, por ser um substrato adesivo permissivo à migração de células de glioma, justificar-se-ia a preferência dessas em migrar no espaço peri-vascular. Por outro lado, a produção de FN pelas células tumorais teria um papel na remodelação da MEC circundante.

A LN e a FN são potentes mediadores da adesão e motilidade celulares em diversas células tais como: fibroblastos, células da crista neural e células tumorais. Os principais receptores de superfície celular para a FN são as integrinas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ e $\alpha_9\beta_1$), capazes de ativar cascatas de sinais intracelulares diretamente relacionados com o controle do ciclo celular. A FN é secretada pelas células sob a forma de dímeros solúveis, organizados como filbrilas multiméricas na superfície celular. As integrinas apresentam um papel essencial na fibrilogênese da FN, pois mediam a interação desta com elementos do citoesqueleto interferindo nas GTPases da família Rho, na FAK, no Src, na paxilina, na vinculina e na α -actinina. Han et al. (2001) mostraram que citocinas produzidas pelo próprio tumor (TGF- β 1) podem cooperar com a integrina $\alpha_5\beta_1$ na regulação da paxilina em astrocitomas malignos aumentando a capacidade de adesão dessas células à FN e também a dispersão dessas em FN (HAN et al., 2001; WIERZBICKA-PATYNOWSKI e SCHAWARZBAUER, 2003).

Um fato interessante evidenciado por Halfter et al. (1989) foi que a detecção imunocitoquímica da FN indica que ela se encontra preponderantemente na superfície das células e não na matriz extracelular. Por outro lado, Ohnishi et al. (1998) mostraram por análises imunohistoquímicas em 14 tumores cerebrais, dentre eles 9 GBMs, que a FN é expressa nos tumores principalmente nas membranas basais dos vasos e na matriz extracelular do tecido tumoral. A FN não foi identificada nas células tumorais, mas o receptor de FN foi expresso tanto nas membranas basais associadas aos vasos, quanto nas membranas das células tumorais. (OHNISHI et al., 1998; HALFTER et al., 1989).

Em outro trabalho Ohnishi et al. (1997) mostraram que linhagens de gliomas humanos (U373MG, A172, T98G) aumentaram sua motilidade na presença de FN solúvel, e essa migração foi tanto quimiotáctica, quanto quimiocinética. As linhagens apresentaram ainda uma adesão dose-dependente à FN, variável de acordo com a linhagem. Os autores observaram também uma eficiente migração haptotáctica, isto é, migração na presença de um substrato sólido de FN, para todas as linhagens e ademais, a integrina $\alpha_5\beta_1$, que é um dos receptores de FN, foi expressa por todas as linhagens em graus variáveis. Além disso, o uso de peptídeos-RGD bloqueou a adesão celular nas linhagens, mas a migração celular, por sua vez, foi diminuída em apenas uma delas (T98G). Lembremos aqui que a FN liga-se às integrinas através da bem conhecida seqüência tripeptídica RGD (PANKOV e YAMADA, 2002). Esse resultado evidencia que a integrina $\alpha_5\beta_1$ está associada com a adesão celular e não necessariamente com a migração das linhagens estudadas, e que outras integrinas estariam envolvidas no comportamento migratório dos gliomas analisados (OHNISHI et al., 1997). Outro fato interessante observado por Onishi et al. (1997) foi que a FN solúvel induziu fortemente a capacidade invasiva em Matrigel® de algumas linhagens. Esse fato sugere que a FN poderia agir *in vivo* como um estímulo para a migração/invasão e, portanto, para o desprendimento das células do sítio primário do tumor. Durante o processo invasivo a proteólise mediada por enzimas sintetizadas pelo tumor e por outros tipos celulares liberaria a FN das membranas basais da barreira-hematoencefálica para os espaços extracelulares. Tal FN agiria quimiocineticamente induzindo a invasão das células tumorais próximas e permitindo a disseminação do tumor. No entanto, como uma das linhagens estudadas não mostrou um aumento na sua capacidade invasiva na presença de FN solúvel, então devem existir diferentes fatores de influência na invasão de gliomas *in vivo* (OHNISHI et al., 1997).

Kita et al. (2001) mostraram ainda que a linhagem de glioma humano CL U251 apresenta uma alta migração em FN e que esse comportamento é dependente da expressão da integrina $\alpha_5\beta_1$ e não $\alpha_v\beta_3$. No entanto, células transfectadas com o fator de transcrição *ets-1* apresentaram uma redução na capacidade migratória decorrente da regulação negativa da subunidade α_5 . O *ets-1* é um fator de transcrição associado ao fenótipo maligno de diferentes células tumorais e regula transcricionalmente genes envolvidos com a degradação da MEC (MMPs, uPA e TIMPs), com a adesão celular (integrinas e caderinas) e com os fatores de crescimento (PDGF, flt-1, polissacarídeos e etc) - KITA et al. (2001).

Embora alguns estudos classifiquem a FN como um substrato menos permissivo, a quase totalidade dos trabalhos acerca de gliomas mostra um papel indutor dessa glicoproteína sobre a migração celular. Aparentemente existe um efeito celular diferenciado entre a FN exógena e aquela que foi produzida pelo tumor. A proteína exógena parece exercer um efeito estimulatório mais intenso na motilidade celular, enquanto a FN derivada do tumor apresenta um papel inibitório na migração. Estudos mostram ainda que células de glioma apresentam a preferência de migrar ao longo de células mesenquimais FN-positivas nos tecidos intra-cerebrais, evidenciando um forte papel dessa proteína também na capacidade infiltrativa desses tumores (BOUTERFA et al., 1999; COUCHMAN et al., 1982 *apud* BOUTERFA et al., 1999).

Além da FN, outra glicoproteína adesiva que apresenta um papel relevante no metabolismo migratório de gliomas é a vitronectina. A vitronectina (VN) é um substrato adesivo para uma grande gama de tipos celulares e liga-se às integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$. Essa glicoproteína é produzida pelo fígado e está presente no soro, assim a sua expressão por células não hepáticas é dependente da indução em condições fisiológicas muito específicas. A vitronectina apresenta ainda sítios de ligação com o colágeno, glicosaminoglicanas (GAGs) e heparina, e está ancorada na MEC sob a forma de multímeros. Suas funções são muito diversas e entre elas destacam-se: adesão e migração celulares, ancoragem de elementos de MEC (como colágeno e GAGs), fibrinólise, proliferação celular (mediada por integrinas e via fatores de crescimento), controle do sistema imune, entre outras (SCHVARTZ et al., 1999).

A expressão da VN tem sido reportada em diferentes tipos tumorais e, por ser susceptível à clivagem por proteases (trombina, elastase e plasmina), apresenta um papel na ativação de plasminogênio. Um dos seus receptores, a integrina $\alpha_v\beta_3$, tem um papel na neoangiogênese e a VN tem sido localizada também em áreas de fibrose e necrose tumorais. Outros trabalhos mostram ainda que a VN pode aumentar a secreção de enzimas proteolíticas, como o MMP-2, em células tumorais (SCHVARTZ et al., 1999).

No SNC a VN é muito expressa durante o desenvolvimento e participa na diferenciação de neurônios motores da medula espinhal e neurônios cerebelares (WECHSLER-REYA, 2001). Embora o cérebro adulto humano seja desprovido de VN, sob certas condições patológicas ela é re-expressa tanto no parênquima cerebral, quanto nas membranas basais dos vasos (UHM et al., 1999a). Já em roedores a expressão do RNAm da VN é encontrada em diversos órgãos (cérebro, coração, músculo esquelético, pulmões e

etc) mesmo no animal adulto (SCHVARTZ et al., 1999; SOLEM et al., 1991 *apud* GLADSON et al., 1995). A expressão da VN em tecidos adultos ainda apresenta algumas discordâncias na literatura, dado que alguns autores sugerem que ela esteja presente nas membranas basais de diversos órgãos e outros autores, por sua vez, discordam de tal afirmação.

Em 1991, Gladson e Cheresh identificaram a expressão dessa proteína em astrocitomas malignos, mas não em astrocitomas de baixo grau e no tecido cerebral normal (GLADSON E CHERESH, 1991). Buscando esclarecer o tipo celular responsável pela produção de VN nos tumores, o mesmo grupo de autores (GLADSON et al., 1995) demonstrou por hibridização *in situ*, Northern Blot e RT-PCR a expressão de VN em um modelo de glioma *in vivo* (injeção das células de astrocitoma humano U-251MG em camundongos scid). Nesse modelo, os pesquisadores observaram que a detecção do RNAm da VN encontrava-se preponderantemente nas bordas do tumor e poucas células marcadas foram encontradas no centro do tumor. A detecção protéica da VN foi confirmada pelos autores com imunohistoquímica e as bordas do tumor também co-expressaram a subunidade α_v das integrinas. Por outro lado, o tecido normal do cérebro dos camundongos não expressou o RNAm para a VN. Um fato interessante é que células U-251MG não são capazes de expressar o gene da VN (mas expressam a subunidade da integrina α_v) quando injetadas subcutaneamente em camundongos, o que sugere que não apenas o grau de malignidade, mas também o microambiente tecidual local tem um papel indispensável na expressão gênica da VN (GLADSON et al., 1995).

Como já citado, a VN pode aderir às células via diferentes integrinas ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$) que são expressas em linhagens de gliomas humanos num padrão bem distinto. Gladson et al. (1995) mostraram que *in situ* as subunidades α_v e β_5 são expressas no parênquima tumoral, contrastando com a expressão da subunidade β_3 que foi expressa nas margens do tumor e co-localizada com a VN. Uhm et al. (1999a) evidenciaram ainda que a VN poderia ter um papel na resistência a quimioterapias (GLADSON et al., 1995; UHM et al., 1999a).

Os autores mostraram que células de glioma humano (U251) tratadas com topotecan, um forte indutor de apoptose, apresentaram um índice apoptótico muito reduzido quando crescidas na presença de VN em comparação com FN. Assim, a VN serviria não apenas como um substrato adesivo para as células de glioma, mas também como um inibidor de apoptose, via a sua ligação com a integrina $\alpha_v\beta_3$. Os autores mostraram ainda que o cultivo das linhagens analisadas (U251 e D54) em frascos recobertos com VN induziu a expressão de Bcl-2 e Bcl-X, duas proteínas anti-apoptóticas. Além disso, o bloqueio da ligação receptor

celular-ECM usando antagonistas de integrinas (cycRGD) inibiu esse efeito protetor da VN, o que associa a integrina $\alpha_v\beta_3$ ao aumento da expressão dessas proteínas anti-apoptóticas (GLADSON et al., 1995; UHM et al., 1999a).

Outros elementos de MEC presentes nas membranas basais associadas aos vasos cerebrais são os colágenos. As células de GBM são capazes de sintetizar colágeno IV *in vitro* e Bjerkvig et al. (1989) evidenciaram a expressão desse elemento de matriz por esferóides de linhagens de glioma de rato. A marcação *in vitro* de colágeno IV nos vasos tumorais tem sido usada para evidenciar anormalidades vasculares de gliomas, tais como a duplicação e ruptura da membrana basal associada aos vasos e o aumento da densidade vascular. Além disso, estudos mostram que as próprias células tumorais são capazes de sintetizar o colágeno IV nas áreas que rodeiam sítios de proliferação vascular; e em GBMs as células gigantes podem ocasionalmente expressar colágeno IV (CHINTALA et al., 1996a; BJERKVIG et al., 1989).

Paulus et al. (1994) mostraram por imunohistoquímica que o padrão de expressão de colágeno IV, assim como colágeno I e III, muda consistentemente quando são comparadas biópsias de GBMs com os cultivos primários e com cultivos em esferóides destes. Enquanto a expressão (RNAm e proteína) dos colágenos foi restrita aos vasos e áreas de proliferação *in vivo*, as monocamadas cultivadas apresentaram uma neoexpressão citoplasmática desses elementos de MEC em diversas células tumorais e os cultivos em esferóides evidenciaram colágenos entre as células de glioma. Um fato a ser ressaltado é que a expressão de GFAP diminuiu com o aumento do número de passagens (repiques) *in vitro*, o que evidencia o processo chamado “derivação mesenquimal”. A “derivação mesenquimal” é o desenvolvimento de características mesenquimais e a perda da diferenciação glial em células de glioma *in vitro*. O trabalho de Paulus et al. (1994) mostrou que o desenvolvimento das características mesenquimais observadas em *in vitro* foi decorrente da transdiferenciação das próprias células de glioma e não da participação das células mesenquimais (endoteliócitos e fibroblastos) presentes no cultivo primário (PAULUS et al., 1994).

1.4.1.2 Outros elementos de MEC importantes na migração de gliomas

Diversos trabalhos mostram que a TN-C, apresenta uma expressão elevada em tumores gliais e a sua alta expressão (que chega a se apresentar até quatro vezes mais

expressa em GBMs do que em tecidos normais) pode ser relacionada com o grau de malignidade do tumor. Além disso, a TN-C pode sustentar a invasão *in vitro* (GIESE et al., 1995). Diferentes concentrações de TN-C no substrato levaram a um padrão bifásico de migração em três linhagens de glioma estudadas; baixas concentrações de TN-C mostraram-se mais permissivas à migração, enquanto altas concentrações constituíram um substrato pouco permissivo. Essa observação se opõe aos resultados obtidos para o colágeno, LN, merosina e FN, que mediaram uma migração monofásica e densidade-dependente em células de glioma. Assim, a TN-C apresentaria um comportamento único de inibir a migração quando disponibilizada em altas densidades (BERENS et al., 1994, GIESE et al., 1996). Herold-Mende et al. (2002) citam ainda que a expressão de TN-C parece tornar-se mais heterogênea com o aumento do grau de anaplasia do glioma. Tal fato é especialmente intrigante dado que o cérebro normal adulto de mamíferos quase não apresenta a expressão de TN-C (KIM et al., 2000; HEROLD-MENDE et al., 2002).

Além disso, tem sido proposto que os elementos de MEC associados aos tumores gliais são produzidos tanto pelas próprias células tumorais, quanto pelas células do estroma do tecido normal, que são induzidas por sinais tumorais. De fato, as células vasculares como as células endoteliais e células de músculo liso vascular estão diretamente implicadas na neoangiogênese associada à GBMs. Zagzag et al. (1996) mostraram por microscopia eletrônica (imuno-ouro) e hibridização *in situ* que células endoteliais produzem TN-C *in vitro* e em GBMs humanos essa glicoproteína deposita-se nos vasos neoformados do tumor. Os pesquisadores evidenciaram ainda que células de GBMs e astrocitomas anaplásicos expressam a TN-C como uma fina rede fibrilar envolvendo as células tumorais, sendo essa expressão heterogênea entre as células e localizada na interface do tumor com o tecido normal. Zagzag e colaboradores (1995) sugerem ainda que as células de glioma têm a preferência de invadir os vasos que expressam TN-C. Um outro fato ressaltado por Kim et al. (2000) é que a expressão de TN-C por GBMs humanos é mais evidente ao redor das células tumorais, mas pode ser encontrada também envolvendo vasos e na rede tumoral (BOUTERFA et al., 1999; ZAGZAG et al., 1996; ZAGZAG et al., 1995; KIM et al., 2000; HEROLD-MENDE et al., 2002).

Esses resultados em conjunto sugerem um papel da TN-C não apenas na migração tumoral, mas também no evento de neoangiogênese. É sabido que a TN-C pode tanto estimular, quanto inibir a migração em células de glioma. Uma explicação para esses resultados conflitantes é que o papel sobre a migração e diferenciação da TN-C pode estar relacionado também com o tipo celular que a produz, dado que células normais não

sintetizam a mesma combinação de isoformas de TN-C que as células tumorais. Como mostrado por Bouterfa et al. (1999) fatores solúveis como citocinas e fatores de crescimento poderiam induzir a expressão de MEC pelas células tumorais sem a necessidade que essas mantivessem contatos diretos com as células normais do cérebro (BOUTERFA et al., 1999; HEROLD-MENDE et al., 2002).

Terapias anti-tumorais baseadas na expressão diferencial de TN-C por gliomas têm sido desenvolvidas. Reardon et al. (2002) mostraram que a administração de anticorpos anti-TNC (marcados com I^{131} radioativo) no espaço deixado pelo tumor excerto permitiu uma radioterapia seletiva e localizada, resultando em um aumento da sobrevida dos pacientes com GBM. Além disso, a concentração de TN-C no líquido cérebro-espinhal tem sido usada como um marcador para a diagnose e planejamento de tratamentos em tumores cerebrais (REARDON et al., 2002; YOSHIDA et al., 1994).

O ácido hialurônico (HA) é a principal glicosaminoglicana (GAG) expressa no cérebro e apresenta uma íntima relação com a capacidade invasiva dos gliomas. Sua estrutura é capaz de criar espaços altamente hidratados formando na MEC pontos de reestruturação, reorganização e permissividade à invasão. A inibição, com seqüências antisense, das sintases de HA (HAS2 e HAS3) leva a uma queda tanto no crescimento tumoral quanto na sua densidade vascular (70-80%). O HA é também capaz de influenciar na capacidade angiogênica dos tumores. A sua estrutura de alto peso molecular pode inibir a neovascularização, todavia, os oligossacarídeos resultantes da sua degradação promovem a angiogênese e o crescimento tumorais. A presença de HA pericelular influencia na invasão e na transdução de sinais (via fosforilação de quinases serina/treonina) podendo ser diretamente relacionada ao grau de malignidade tumoral (TOOLE e HASCALL, 2002). Essa GAG também modula a expressão de citocinas e de outras proteínas envolvidas no remodelamento da MEC. Além disso, a integridade estrutural do cérebro é dependente da ligação do HA com as suas proteínas ligantes, as hialaderinas. As conformações adotadas pelo HA após a sua interação às hialaderinas evidenciam a natureza dinâmica dessa GAG que é capaz de assumir estados de energia de ligação diversos (RADOTRA e MACCORMICK, 1997; TURLEY et al., 2002; DAY e PRESTWICH, 2002).

Diferentes evidências mostraram que a expressão de proteoglicanos também está alterada no estroma de diversos tipos tumorais, e tal fato sugere um papel desses elementos de matriz na progressão, invasão e crescimento tumoral. Uma propriedade fundamental dos proteoglicanos pericelulares é a habilidade de interação com outras

moléculas, o que pode modular a adesão e diferenciação tecidual. De fato, os proteoglicanos agem como co-receptores na adesão celular (mediada por CAMs, integrinas e galactosiltransferase) e via ligações com elementos de matriz como a LN e FN. Trabalhos sugerem ainda que o padrão de sulfatação das cadeias de GAGs apresenta um papel nas interações moleculares entre as células tumorais e os elementos de matriz do microambiente local. GAGs sulfatadas liberadas da matriz extracelular apresentam ainda a capacidade de ativar enzimas latentes e fatores de crescimento, além de induzir a degradação proteolítica (MENDES DE AGUIAR et al., 2002; WEGROWSKI e MAQUART, 2004; DOW e WANG, 1998; BRUNNER et al., 1998).

Nesse contexto, Mendes de Aguiar et al. (2002) procuraram responder se o padrão de sulfatação das GAGs interferiu, ou não, na morfologia, adesão e proliferação de células de glioma *in vitro* (C6). Os autores observaram que houve uma queda significativa na proliferação das células C6 quando tratadas com clorato de sódio. O clorato de sódio promove a dessulfatação de proteoglicanos. Além disso, foi observada uma redução na habilidade dessas células em se aderirem a diferentes elementos de MEC (colágeno IV, LN e FN), o que sugere um papel do padrão de sulfatação dos proteoglicanos na adesão de células de glioma. As células apresentaram um aumento na expressão de FN, mas seu padrão de expressão, que é tipicamente fibrilar, foi alterado com o tratamento, sugerindo que proteoglicanos pouco sulfatados não seriam capazes de interagir apropriadamente com a FN (MENDES DE AGUIAR et al., 2002).

Diversos trabalhos mostram que o brevican é regulado positivamente em gliomas (incluindo oligodendrogliomas, todos os graus de astrocitoma e gliosarcomas) o que sugere um papel na invasão (NUTT et al., 2001a; NUTT et al., 2001b; GARY et al., 1998; ZHANG et al., 1998). Nesse contexto, tanto a expressão quanto a clivagem proteolítica do brevican são elementos críticos para a invasão tumoral.

Como já citado, o brevican liga-se a glicolipídios da superfície da membrana plasmática e, mediado pela TN-R, pode associar-se ao HA (HAGIHARA et al., 1999). Essa molécula também apresenta uma isoforma capaz de ancorar-se à membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI) (SEIDENBECHER et al., 1995) e sua expressão é muito aumentada nas células precursoras gliais e nos tumores gliais (JAWORSKI et al., 1995). A forte expressão do brevican durante a gliose reativa também sugere um papel desse proteoglicano na proliferação e motilidade glial. Além disso, diferentes isoformas de brevican já foram identificadas, sendo que algumas delas apresentam-se isentas de cadeias de

GAGs. Viapiano et al. (2003) identificaram uma isoforma de brevicana pouco (ou não) glicosilada (a B/b₁₃₀) gerada por alterações pós-transcricionais. Os autores observaram ainda que essa isoforma foi a mais expressa em um modelo de glioma (CNS-1) *in vivo* (VIAPIANO et al., 2003).

A clivagem do brevicana (145 kDa) divide os domínios N-terminal (que abriga o sítio de ligação com o HA) e C-terminal e é capaz de romper a rede de MEC; além disso, os produtos clivados (90 kDa e 50 kDa) de brevicana competem com a molécula de alto peso molecular pelo HA. Um fato interessante é que o brevicana não é expresso em tumores não gliais, metástases desses tumores no cérebro ou em células de glioma *in vitro*; a sua expressão se dá apenas em tumores gliais *in vivo*, sugerindo que apenas o SNC fornece os estímulos necessários para a sua expressão (JAWORSKI et al., 1996).

Zhang et al. (1998) testaram o papel do brevicana na invasão tumoral através da análise de células de glioma transfectadas com o gene do brevicana, de alto peso molecular (145 kDa), e com o gene que codificava apenas para o N-terminal do brevicana. Apesar de ambas as células transfectadas terem sido capazes de invadir Matrigel® *in vitro*, apenas aquelas transfectadas para produzirem o brevicana “truncado” (N-terminal) foram capazes de invadir o cérebro de ratos *in vivo*. Diferentes trabalhos sugeriram que a clivagem de brevicana é mediada pelas metaloproteases (MMPs), que são as enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da MEC. Contudo, a não alteração dos níveis de clivagem de brevicana por inibidores específicos de MMPs, também conhecidos como TIMPs, indicaram que essas MMPs apresentavam uma estrutura atípica. De fato, Matthews et al. (2000) evidenciaram mais tarde que o mais forte candidato para a clivagem de brevicana é a ADAMTS-4; as ADAMTS pertencem a um grupo de proteases específicas que integram a família das metaloproteases (NUTT et al., 2001a; NUTT et al., 2001b; GARY et al., 1998; ZHANG et al., 1998; MATTHEWS et al., 2000).

Juntamente com o brevicana outros PTGs ligantes de HA apresentam um papel importante na migração de células neuroepiteliais durante o desenvolvimento. Entre esses PTGs temos o agrecan, o versican e o neurocan.

O versican é um proteoglicano condroitin sulfato, cujo processamento alternativo do RNAm gera 4 diferentes isoformas, algumas muito expressas em tumores. Apesar da expressão do RNAm de versican ser identificada em tumores cerebrais, a sua expressão protéica no SNC normal apresenta-se relativamente baixa e restrita à região pericelular.

Esse proteoglicano também é expresso em áreas perinecroticas o que sugere uma influência de citocinas e fatores necróticos na sua produção.

Buscando compreender o papel do versican em astrocitomas, Wu et al. (2001) desenvolveram genes recombinantes do domínio G3 de versican com e sem as repetições semelhantes à EGF. Células de astrocitoma transfectadas com o gene de versican G3 conservado apresentaram um aumento significativo em sua proliferação, ao contrário das células que foram transfectadas com o gene que apresentava as repetições EGF excluídas. Os autores observaram que, o versican mutado competia com o versican endógeno pela ligação com a superfície da célula, e inibia a sua secreção. Assim, o versican agiria na proliferação via ligação com a superfície da célula (WU et al., 2001).

Em outros trabalhos, o mesmo grupo de pesquisadores observou que células de astrocitoma (U87) transfectadas com o gene de versican mutado (sem domínios EGF) apresentavam um aumento na expressão da subunidade β_1 das integrinas, tal fato sugeriu que a ação de versican sobre a proliferação celular era dependente da sua ligação com a célula via integrinas. De fato, o versican mostrou-se capaz de ligar-se a essa integrina de forma RGD independente. Além disso, essas linhagens perderam as suas características tumorais, como o crescimento ancoragem-independente, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Os autores sugeriram um forte papel da via de sinalização das integrinas versus receptor de EGF no fenótipo maligno de astrocitomas (WU et al., 2004; WU et al., 2002).

1.4.2 A adesão

1.4.2.1 As integrinas e os seus papéis na migração de gliomas

Caracterizado o substrato disponibilizado às células tumorais, mais especificamente os gliomas, o próximo passo do evento migratório é o reconhecimento e adesão das células neoplásicas a esses elementos de MEC. Esse papel adesivo é exercido por diferentes moléculas de adesão que na verdade apresentam uma função muito mais ampla do que meramente aderir aos elementos de matriz. O passo adesivo da migração inicia uma série de comunicações célula-matriz que promovem a diferenciação, crescimento e escape da apoptose, além de suprir a célula com os sítios físicos de ancoragem necessários à movimentação do corpo celular. Esse complexo processo é mediado por diversas moléculas como os ligantes de HA, proteoglicanos de membrana e principalmente as integrinas.

Apesar de já terem sido superficialmente apresentadas nesta introdução, as integrinas merecem um tópico à parte no contexto migratório dos gliomas.

As integrinas são receptores de superfície que mediam as interações físicas e funcionais entre as células e a matriz extracelular. Esses receptores apresentam-se como heterodímeros e as diferentes composições das cadeias α e β determinam o repertório de moléculas com a qual eles interagem. Nos mamíferos foram identificadas 18 subunidades α e 8 subunidades β capazes de formar as 24 integrinas conhecidas atualmente. A especificidade das integrinas com os seus ligantes pode tanto ser limitada quanto promíscua, por exemplo, a integrina $\alpha_5\beta_1$ reconhece apenas a FN, enquanto a $\alpha_v\beta_3$ interage com diversos ligantes (VN, FN, fibrinogênio e fator de von Willebrand) (GUO e GIANCOTTI, 2004; ROOPRAI et al., 1999). A Figura 12 apresenta as principais integrinas conhecidas e a tabela 1 os seus respectivos ligantes.

Classicamente as integrinas foram descritas como mediadoras da adesão celular, no entanto hoje se sabe que suas funções são muito mais diversas dado que transmitem sinais tanto mecanicamente, quanto quimicamente. Assim como exercem um papel na polaridade celular e na reorganização do citoesqueleto, as integrinas podem ainda sinalizar para diversas outras funções diretamente envolvidas com a adesão, migração, proliferação mediada por fatores de crescimento, diferenciação, sobrevivência e apoptose celular (UHM et al., 1999b; GUO e GIANCOTTI, 2004).

Muitas integrinas ativam a quinase de adesão focal (FAK) e consequentemente a família das Src quinases (SFKs) que, por sua vez, fosforilam a p130CAS e a paxilina.

Outras integrinas (como a $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$) podem ativar a via que é mediada pela proteína SHC através de Fyn e Yes, enquanto as integrinas $\alpha_6\beta_4$ e $\alpha_2\beta_1$ apresentam mecanismos de sinalização específicos. (GUO e GIANCOTTI, 2004). A figura 13 mostra um resumo das principais vias de sinalização das integrinas. Outras moléculas podem se associar fisicamente com as integrinas formando complexos na membrana plasmática. Esses complexos (que incluem uma grande variedade de proteínas integrais e periféricas) podem modular a função das integrinas e em alguns casos ativar vias específicas. As integrinas exercem ainda um papel relevante na degradação da MEC via associação com diferentes proteases. O complexo integrina-MMP pode localizar o elemento de MEC e degradá-lo no mesmo sítio da membrana onde ocorre a adesão e a promoção da migração celular. A tabela 2 mostra as principais proteínas capazes de se ligarem a integrinas e as suas principais funções.

Figura 12: Subunidades α e β das integrinas e suas possíveis associações.

TABELA 1: PRINCIPAIS LIGANTES DAS INTEGRINAS

β_1	α_1 Colágenos (I, II e IV), LNs (1 e 2) α_2 Colágenos (I, II e IV), LNs (1 e 2), Condroadarina α_3 LNs (2, 5, 8, 10 e 11), Colágeno I, FN, Trombospondina α_4 FN, VCAM α_5 FN α_6 LNs (1, 2, 5, 8, 10 e 11) α_7 LNs (1, 2, 8 e 10) α_8 FN, TN α_9 TN α_{10} Colágenos α_{11} Colágenos α_v FN, VN
β_2	α_L ICAMs α_M Fibrinogênio, ICAMs, iC3b α_X Fibrinogênio, ic3B α_D VCAM, ICAMs
β_3	α_{IIb} Colágenos, FN, VN, Fibrinogênio, Fator de von Willebrand, Trombospondina α_v FN, VN, Fibrinogênio, Fator de von Willebrand, Trombospondina
β_4	α_6 LNs (1, 2, 5 e 10)
β_5	α_v VN
β_6	α_v FN, TN
β_7	α_4 FN, VCAM, MAdCAM α_E E-caderina
β_8	α_v Colágenos, LNs, FN

Figura 13: Resumo das principais vias de sinalização das integrinas. Ao se ligarem aos elementos de MEC as integrinas transduzem sinais intracelulares via diferentes vias e moléculas adaptadoras. Sua ação é mediada por tirosinas quinase (p.e, a família Src) e algumas dessas vias, como a mediada por Shc, Ftn e Yes e a via de FAK, compartilham sua regulação com receptores de fatores de crescimento como o EGFR (BIOSOURCE INTERNATIONAL, 2006).

TABELA 2: PROTEÍNAS CAPAZES DE SE ASSOCIAR FISICAMENTE COM INTEGRINAS*

Proteína	Tipo de associação	Integrina	Função
Proteases			
MMP1	periférica	$\alpha_2\beta_1$	Degradação da MEC
MMP2	periférica	$\alpha_v\beta_3$	Degradação da MEC
Receptores			
uPAR	GPI - ligada	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_M\beta_2$,	Degradação da MEC
CD16	GPI - ligada	$\alpha_M\beta_2$	Receptor IgG Fc
CD14	GPI - ligada	$\alpha_M\beta_2$	Prot. ligante de lipopolissacarídeo
Receptor de EGF	Integral tipo I	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$	Receptor de fator de cresc. Tirosina
Receptor de PDGF	Integral tipo I	$\alpha_v\beta_3$	Receptor de fator de cresc. Tirosina
Receptor de insulina	Integral tipo I	$\alpha_v\beta_3$	Receptor de fator de cresc. Tirosina
P2Y	heptaspanina	$\alpha_v\beta_3$	Receptor de ATP
CD47	pentaspanina	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$	Receptor para trombospondina e SIRPa
Transportadores / canais			
CD98	Integral tipo II	Múltiplas integrinas	Transportador de aminoácidos
Kv1.3	Seis segmentos	Integrinas β_1	Canal potássio voltagem-dependente
Função Desconhecida			
TM4SF	tetraspanina	Múltiplas integrinas	desconhecida
CD147 (EMMPRIN)	Integral tipo I	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$	Indução de MMPs

*Tabela adaptada de Brown (2002).

No contexto das células tumorais, o padrão de expressão das integrinas está relacionado com o fenótipo maligno e diferentes trabalhos relacionam essa expressão com a transformação neoplásica (GUO e GIANCOTTI, 2004; BRAKEBUSCH et al., 2002). Em geral as células neoplásicas apresentam uma menor dependência da MEC para sua sobrevivência, mas apesar dessa relativa independência de ancoragem elas se beneficiam da sinalização mediada pelas integrinas em favor de sua migração, proliferação e escape da apoptose. Além disso, essas células parecem não expressar as integrinas que apresentam ações contrárias.

A partir da década de 90, diversos trabalhos buscaram caracterizar o padrão de expressão das integrinas em gliomas, em comparação com o cérebro normal e/ou astrócitos. Paulus e Tonn (1994) evidenciaram a super-expressão das integrinas $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ em linhagens de GBM (U-138 MG, U-373 MG e GaMg) em comparação com astrócitos normais. Gingras et al. (1995) realizaram a primeira análise comparativa entre a expressão de integrinas em GBMs *in vivo* e o tecido normal. Os pesquisadores evidenciaram que as integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ foram muito mais fortemente expressas nos GBMs do que nos tecidos normais. O tecido normal apresentou a expressão fraca da subunidade β_1 e da integrina $\alpha_v\beta_3$ e, além disso, os autores observaram uma expressão diferencial das integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$ entre o endotélio tumoral e normal. Em outro trabalho, Pijuan-Thompson et al. (1997) mostram a expressão das integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ em uma linhagem (U251MG) de astrocitoma maligno (PAULUS e TONN, 1994; GINGRAS et al., 1995; PIJUAN-THOMPSON et al., 1997).

Em 1993, Paulus et al. mostraram que em gliomas uma das integrinas mais expressas foi a $\alpha_3\beta_1$. Anos depois, Kishima et al. (1999) evidenciaram por RT-PCR e imunohistoquímica que a expressão do RNAm da subunidade α_3 das integrinas está presente em gliomas humanos e que essa expressão pode ser correlacionada com o grau de anaplasia do tumor.

Naganuma et al. (2004) mostraram em dez linhagens de gliomas malignos a expressão da integrina $\alpha_3\beta_1$, mas o tratamento das linhagens com TGF- β_2 não foi capaz de interferir na sua expressão. A subunidade α_3 reconhece a LN, a FN e diferentes colágenos e no cérebro normal sua expressão é praticamente indetectável. Em outros tipos tumorais a expressão de $\alpha_3\beta_1$ tem sido correlacionada tanto com um aumento da malignidade (cânceres gástricos e cólon-retais), quanto com uma diminuição da capacidade invasiva do tumor (rabdomyosarcomas). Conjuntamente esses dados sugerem um papel da subunidade α_3 na

transformação tumoral (PAULUS et al., 1993; KISHIMA et al., 1999; NAGANUMA et al., 2004).

Embora a grande maioria das subunidades α das integrinas (α_2 à α_7 e α_v) seja identificada em cultivos de células de glioma, apenas as subunidades α_2 , α_3 e α_6 são consistentemente expressas *in vivo* por células de glioma humano. Por outro lado, a super-expressão da subunidade β_1 por gliomas parece ser um consenso na literatura.

Os heterodímeros da subfamília β_1 das integrinas ligam-se a diferentes elementos de MEC como colágenos (α_1 , α_2), LNs (α_1 , α_2 , α_3 , α_6 , α_7 , α_9), FN (α_3 , α_4 , α_5 , α_8 , α_v) e VN (α_v). Embora muitas integrinas β_1 possam interagir com os mesmos ligantes, a informação transduzida por cada uma difere (BRAKEBUSCH et al., 1997). No cérebro normal de ratos, Grooms et al. (1993) identificaram a subunidade β_1 das integrinas principalmente nas paredes dos vasos, células do plexo coróide, nas células endoteliais, na pia mãe e na glândula pineal (GROOMS et al., 1993).

Em 1996, Paulus et al. estabeleceram um elegante modelo de regulação da subunidade β_1 das integrinas no glioma de rato C6. A subunidade β_1 pode associar-se com, pelo menos, 12 cadeias α diferentes (α_1 à α_{11} e α_v) e forma o maior grupo de receptores na grande família das integrinas. Entre seus ligantes encontram-se os principais substratos migratórios dos gliomas como a FN, a LN, os colágenos, a TN e a VN. Os autores utilizaram um sistema onde as células C6 foram transfectadas com o gene tTA e com seqüências anti-sense para a β_1 controladas por um promotor responsivo à tetraciclina. Assim, os níveis endógenos de β_1 nas células não foram afetados na presença de tetraciclina, por outro lado, a ausência de tetraciclina permitiu a ativação transcricional das seqüências β_1 anti-sense e, portanto, a redução da expressão protéica de β_1 . As células transfectadas foram então inseridas nos cérebros de camundongos nude. A análise dos gliomas *in vivo* mostrou que, na presença de tetraciclina (quando a expressão de β_1 endógeno foi mantida) houve uma invasão difusa nas bordas tumorais e observou-se a presença de células de glioma próximas aos capilares e formando aglomerados no neuropil. Na ausência de tetraciclina os tumores apresentaram uma redução da expressão de β_1 e concomitante perda da habilidade invasiva nas bordas do tumor. Nesses animais os tumores apresentaram-se compactados e bem definidos. O trabalho mostrou que a subunidade β_1 das integrinas é requerida no processo migratório / invasivo de células de glioma *in vivo* (PAULUS et al., 1996).

Rooprai et al. (1999) confirmaram essa afirmação analisando a expressão de integrinas em células em cultivo derivadas de gliomas com diferentes graus de malignidade. Os pesquisadores mostraram por imunohistoquímica que a expressão da subunidade β_1 foi mais alta que a das subunidades α_v e α_4 na maioria dos cultivos estudados. Além disso, o bloqueio de β_1 com anticorpos específicos inibiu a adesão, migração e invasão em todos os cultivos. Contudo, devido ao número escasso de tumores, os autores não puderam relacionar a expressão das integrinas com o grau de malignidade dos gliomas (ROOPRAI et al., 1999). Tysnes et al. mostraram *in vitro* que o uso de anticorpos anti- β_1 foi capaz de reduzir drasticamente a migração de células de glioma. Já a inibição da integrina $\alpha_3\beta_1$ reduziu a migração de linhagens de astrocitomas em LN (TYSNES et al., 1996; FUKUSHIMA et al., 1998).

Outras subunidades β também parecem influenciar no metabolismo de gliomas. Belot et al. (2001) relacionaram a subunidade β_5 a um aumento da capacidade migratória de gliomas *in vitro*, e à prognose *in vivo*. Os autores mostraram ainda que a expressão de β_5 mudou expressivamente em astrocitomas anaplásicos, mas não em astrocitomas de baixo grau, o que mostra que a modulação da expressão de β_5 está associada a eventos mais tardios da progressão tumoral de gliomas. A subunidade β_5 dimerizada com α_v é responsável pelo reconhecimento de FN. Em outro trabalho, Tonn et al. (1998) mostraram que o uso de anticorpos contra a integrina $\alpha_v\beta_5$ reduziu a invasão de células de glioma humano em agregados de cérebro de rato (BELOT et al., 2001; TONN et al., 1998).

A subunidade β_8 também parece exercer um papel na migração de gliomas, dado que foi superexpressa em todas as linhagens analisadas por Belot et al. (2001). Essa subunidade interage com α_v e α_9 e entre os seus ligantes podemos destacar a LN-1, o colágeno IV e a FN. Além de β_1 , β_5 e β_8 , a subunidade β_4 também foi identificada em gliomas. Excelentes revisões mostraram ainda o papel desta integrina em outros tipos tumorais e a sua relação com a alta agressividade e baixa prognose (MERCÚRIO e RABINOVITZ, 2001). A integrina $\alpha_6\beta_4$ reconhece a LN e, ao contrário de outros receptores de LN ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$) que são expressos tanto em gliomas, quanto em astrócitos normais, apresenta uma expressão diferencial em astrocitomas humanos. No SNC normal, a expressão de $\alpha_6\beta_4$ apresentou-se restrita às meninges, aos vasos e a alguns astrócitos. Já em astrocitomas, astrócitos reativos induzidos pelo tumor e astrócitos reativos induzidos por inflamação essa integrina foi fortemente expressa (BELOT et al., 2001; PREVITALI et al., 1996; PREVITALI et al., 1997).

Em gliomas induzidos por etilnitrosourea (indução transplacentária) o mesmo grupo de pesquisadores conseguiu distinguir os diferentes tipos celulares (astrócitos normais, astrócitos reativos e células de glioma) através de duplas marcações específicas. Muitas das células neoplásicas são vimentina (+) e GFAP (-), o que sugere que são células imaturas na linhagem glial, os astrócitos reativos são vimentina (+) e GFAP (+) e os astrócitos normais vimentina (-) e GFAP (+). Com essas informações em mãos os autores evidenciaram uma expressão consistente da subunidade β_4 tanto nas células neoplásicas, com uma marcação mais intensa nas áreas proliferativas, quanto nos astrócitos reativos ao redor e dentro do tumor. Por outro lado os vasos tumorais exibiram uma redução da expressão de β_4 em comparação com o tecido normal; os autores sugeriram um papel dessa subunidade na manutenção da barreira hematoencefálica. A imunoprecipitação de β_4 e α_6 evidenciou ainda que essas subunidades estavam associadas e ambas foram identificadas mesmo em estágios muito iniciais do desenvolvimento do tumor. Além disso, a expressão da integrina $\alpha_6\beta_4$ nas áreas proliferativas sugere um papel menor na migração da célula. Um fato a ser ressaltado é que a LN-1 tem uma afinidade baixa por $\alpha_6\beta_4$, ao contrário da LN-2 e LN-5 (PREVITALI et al., 1999).

Um outro fato interessante ressaltado pelos autores foi a expressão de $\alpha_6\beta_4$ nos astrócitos reativos. Provavelmente esses astrócitos são induzidos por fatores de crescimento e citocinas produzidos pelo tumor. De fato, a ativação das integrinas pode acontecer através de uma grande gama de citocinas e imunomoduladores como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina-1 e o forbol éster. Ritchie et al. (2000) evidenciaram ainda que o tratamento de linhagens de GBM com um indutor de NF- κ B induziu a expressão de FN e VN e das subunidades β_3 e α_v das integrinas, sugerindo um papel do NF- κ B na adesão desses neoplasmas. O NF- κ B é um fator regulatório indutor de expressão gênica encontrada em diversos tipos celulares. Além disso, as integrinas apresentam um forte papel na regulação das vias transduzidas por receptores de fatores de crescimento como foi revisado por Lee e Juliano – 2004 (RITCHIE et al., 2000; LEE e JULIANO, 2004).

Além das subunidades β das integrinas, muitos trabalhos se atêm ao papel da subunidade α_v das integrinas no metabolismo migratório/invasivo dos gliomas. Treasurywala e Berens (1998) analisaram quatro diferentes linhagens de gliomas (SF767, U251, G22 e T98G) com comportamentos migratórios diferentes; duas linhagens apresentaram uma migração monofásica dependente da concentração de TN, e as outras duas migraram de

modo bifásico, estimuladas por baixas concentrações de TN e inibidas às altas concentrações. Os autores observaram que as células foram capazes de alterar o seu fenótipo baseadas nas informações da MEC. Além disso, células que expressaram a subunidade α_v apresentaram uma migração bifásica, ao contrário das células que não expressaram α_v . O tratamento com oligonucleotídeos α_v anti-sense em linhagens semeadas em baixas concentrações de TN levou a uma mudança no padrão de migração, que deixou de ser bifásico e passou a ser monofásico. Assim, a alta expressão de α_v e as altas concentrações de TN estão associadas a um fenótipo anti-migratório (TREASURYWALA e BERENS, 1998). Já Taga e colaboradores (2002) evidenciaram que a inibição de α_v com o antagonista EMD 121974 em linhagens de GBM humano (U87MG), endoteliócitos (BCEC) e meduloblastoma (DAOY) inibiu a ligação com VN e TN, induzindo apoptose nas células. A expressão das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ em células de capilares foi associada principalmente à proliferação e, portanto ao evento neoangiogênico (TAGA et al., 2002).

Também está estabelecido hoje o papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ na regulação da migração e proliferação, tanto do glioma, quanto das células endoteliais a ele associadas. A integrina $\alpha_v\beta_3$ apresenta diversos ligantes, entre eles, VN, fibrinogênio, fator de von Willebrand, FN, trombospondina, trombina, osteopontina, sialoproteína do osso, LN e os colágenos I e IV degradados (PIJUAN-THOMPSON et al., 1997). Essa integrina é constitutivamente expressa em todas as células e é regulada por proteínas associadas à integrinas e por fatores de crescimento. Ela é expressa (proteína e RNAm) em tumores astrocíticos humanos e também em células de glioma *in vitro*, mas não no tecido cerebral normal. Em gliomas de alto grau de anaplasia, a integrina $\alpha_v\beta_3$ é fortemente expressa pelas células das bordas infiltrativas do tumor (BELLO et al., 2001; GLADSON et al., 1995; PAULUS et al., 1993) e também pelos vasos neoformados (GLADSON, 1996). A expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ está associada com a elevada produção de um dos seus ligantes, a VN, nas bordas tanto de tumores humanos, quanto no cultivo de seus esferóides (GLADSON et al., 1995). Assim a interação integrina $\alpha_v\beta_3$ / VN pode apresentar um papel na invasão localizada que é característica nos gliomas.

Trabalhos mostraram ainda que essa interação induziu a expressão de enzimas proteolíticas. O reconhecimento da molécula de VN tanto pela integrina $\alpha_v\beta_3$, quanto por uPA, pode co-localizar esses dois ligantes e levar à ativação da cascata proteolítica plasmina/MMP via conversão do plasminogênio para plasmina. Este evento levaria à degradação e remodelagem da MEC que são indispensáveis ao fenótipo invasivo dos

tumores gliais (WEI et al., 1996; BELLAIL et al., 2004). A integrina $\alpha_v\beta_3$ pode também se ligar à MMP-2 em um sítio diferente do RGD e serve para localizar a forma ativa da enzima na superfície de vasos neoformados. Essa ação sugere um papel dos vasos na degradação, remodelação e invasão da MEC circundante (ELICEIRI e CHERESH, 1999).

Pijuan-Thompson et al. (1997) mostraram que há uma íntima regulação cruzada entre as integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$. Em um estudo com a linhagem de astrocitoma maligno U-251, os pesquisadores mostraram que ambas integrinas mediam a internalização de VN em células cultivadas em FN. Ressalte-se aqui que a VN pode ser encontrada sob duas formas, a nativa e a alterada, e apenas a alterada é internalizada pelas células. Contudo, os autores mostraram que em células aderidas à colágeno I e LN, a $\alpha_v\beta_3$ falha em mediar a internalização da VN. A integrina $\alpha_5\beta_1$ mediou a adesão das células em FN, mas falhou na adesão em colágeno I ou LN. Isso sugere que a ligação de $\alpha_5\beta_1$ é necessária para a internalização de VN via $\alpha_v\beta_3$. Uma outra integrina, a $\alpha_v\beta_5$, também foi identificada em astrocitomas e foi capaz de ligar-se à VN e osteopontina. Um aspecto interessante dessa integrina foi que sua expressão varia fortemente de acordo com o tipo celular (PIJUAN-THOMPSON e GLADSON, 1997).

1.4.2.2 Os receptores de HA

O CD44, uma glicoproteína da família das imunoglobulinas, é um dos muitos receptores do HA. A expressão de CD44 se dá exclusivamente na substância cinzenta e a sua ligação com o HA é dependente da ligação, no seu domínio citoplasmático, com a anquirina (LOKESHWAR et al., 1994). Essa glicoproteína também pode ligar-se a FN, LN, VN, colágeno e condroitin sulfato (RANUNCOLO et al., 2002). O CD44 pode ser encontrado na sua forma padrão (CD44s) ou na forma variante (CD44v), cuja expressão está relacionada com a progressão neoplásica. As formas variantes de CD44 são resultantes do "splicing" alternativo do seu RNAm e apresentam uma distribuição restrita no organismo. Esse receptor age na regulação do tráfego celular, nas interações intercelulares, na internalização e degradação do HA, na promoção de tumores e na transdução de sinais. Além disso, a ligação HA-CD44 pode ativar diferentes cascatas de sinais diretamente relacionadas como a proliferação e motilidade celular. A figura 14 mostra as principais vias de sinalização mediadas por CD44.

Figura 14: Vias de sinalizações ativadas pela ligação HA-CD44. A interação HA-CD44 promove a atividade tirosina quinase de HER2 e do receptor Src. O Src fosforila a cortactina que recruta este Src para a membrana celular. A ligação HA-CD44 também ativa RHOA e Rac1, que estão envolvidos com a formação de expansões citoplasmáticas diretamente relacionadas à migração celular. Além disso, o CD44 liga-se a Tiam1 e Vav2. O HA também promove a associação de CD44 com proteínas adaptadoras do citoesqueleto como a anquirina e as proteínas ERM. A ativação dessas vias juntas leva ao fenótipo migratório e invasivo tumoral. Sugere-se ainda que a ligação de CD44 com diferentes proteínas apresentam um papel chave na comunicação entre diferentes vias de sinalização o que leva à múltiplas funções por parte desse ligante de HA, funções essas como a adesão, a proliferação, o crescimento, a migração e invasão (imagem extraída de TURLEY et al., 2002).

Figura 15: Vias de sinalizações ativadas pela ligação HA-RHAMM. O RHAMM é uma hialaderina itinerante que se apresenta em diversos compartimentos celulares e que pode se ligar a face extracelular da superfície da membrana. A interação entre HA e RHAMM na superfície da célula regula vias de sinalização através de Ras e Src. O RHAMM presente na superfície celular pode ainda modificar a habilidade do receptor de PDGF em ativar a Erk quinase que é uma enzima chave na motilidade celular. As proteínas RHAMM intracelulares apresentam diversos sítios de ligação e reconhecimento de quinases, uma dessas formas intracelulares é capaz de ligar-se fisicamente à quinase Erk1. As formas intracelulares do RHAMM podem ainda associar-se a elementos do citoesqueleto, principalmente nos microtúbulos do fuso mitótico durante a interfase. A habilidade do RHAMM em se associar com diversas moléculas do citoesqueleto sugere um papel dessa proteína similar às proteínas adaptadoras como vinculina e paxilina (TURLEY et al., 2002).

No cérebro normal o CD44 é encontrado apenas nos processos celulares astrocíticos, já em tumores a marcação também se dá no citoplasma das células tumorais. A isoforma de menor peso molecular (85kDa), também chamada CD44s ("standard CD44"), é predominantemente expressa na superfície de células tumorais. Esta isoforma apresenta uma maior afinidade pelo HA, mas pode atuar na interação célula-célula também. Dada a pobreza no cérebro de outros ligantes de CD44, como a FN e a LN, a ligação de HA-CD44 apresenta um papel central nas propriedades invasivas de tumores encefálicos.

Altos níveis de CD44s têm sido identificados tanto em cultivos primários de gliomas humanos quanto em linhagens estabelecidas de gliomas. Merzak et al. (1994) e Radotra e McCormick (1997) evidenciaram inclusive que a invasão de células de glioma crescidas em Matrigel® foi diminuída em diferentes graus após o tratamento com anticorpo anti-CD44. Além disso, o tratamento destas células com anticorpos anti-CD44 reduziu a adesão celular à FN, LN, VN e colágeno tipo I. Por outro lado, Akiyama et al. (2001) mostraram que o tratamento com anticorpos anti-CD44 em cultivos de gliomas malignos não levou a uma redução da capacidade migratória das células (AKIYAMA et al., 2001; FRANK et al., 1996; MERZAK et al., 1994; RADOTRA e MCCORMICK, 1997).

Li et al. (1993) evidenciaram ainda que a expressão das variantes de CD44 foi diferencial entre os tumores cerebrais primários e as metástases de tumores sistêmicos. Aparentemente os GBMs super-expressaram a forma padrão (CD44s) desse receptor, enquanto as metástases cerebrais, resultantes de tumores sistêmicos, expressaram a forma variante - CD44v (LI et al., 1993a).

Em cortes histológicos de gliomas humanos, Ranuncolo et al. (2002) evidenciaram uma forte relação entre a expressão de CD44s (as variantes desta glicoproteína não foram expressas nos tumores analisados) e o grau de anaplasia. Ariza et al. (1995) mostraram por imunohistoquímica em 10 GBMs humanos que todos os espécimes expressavam CD44s na superfície das células tumorais (entre 20% e 80% das células), enquanto os vasos não apresentavam marcação. Por outro lado, a imunomarcação das isoformas variantes de CD44 (CD44v3 e CD44v6) não foi observada nestes materiais, fato corroborado via RT-PCR por Li et al. (1993) em 18 linhagens de glioma *in vitro* (RANUNCOLO et al. 2002; ARIZA et al., 1995; LI et al., 1993a). Knüpfer et al. (1999) evidenciaram ainda que diversas linhagens de GBMs humanos *in vitro* (T98G, A172, 86HG39, 85HG66), juntamente com a linhagem de glioma de rato C6, foram capazes de expressar consistentemente o CD44. Contudo, a linhagem C6 apresentou uma taxa de adesão à HA/BSA não significativamente diferente da

adesão em BSA somente. Este dado sugere que as células C6 falham em ligar-se especificamente ao HA, mesmo expressando altos níveis de CD44. No entanto, a capacidade de ligação da linhagem C6 ao HA foi aumentada após tratamentos com hialuronidases. Muitos gliomas são capazes de produzir HA *in vitro* e estocar esta GAG na superfície celular formando os conhecidos “halos pericelulares”, e esses halos poderiam mascarar a ligação do HA da MEC com as células (KNÜPFER et al., 1999).

Um outro receptor proposto para HA é o RHAMM. Apesar de ter sido identificada a sua expressão em neoplasias de células B, pulmão e pancreáticas, e de apresentar um papel crucial na natureza metastática de certos tipos celulares (como fibroblastos), o papel de RHAMM em neoplasias primárias cerebrais ainda é muito discutido (TURLEY et al., 2002).

Hayen et al. (1999) sugeriram que essa hialaderina pode ter a flexibilidade de, mesmo sendo intracelular, se deslocar para a membrana da célula a fim de ligar-se ao HA, desta forma o HA também poderia interagir com RHAMM dentro da própria célula. De fato o RHAMM já foi identificado na superfície celular, associado ao citoesqueleto, no núcleo e em mitocôndrias. O RHAMM é capaz de mediar o sinal do HA num processo dependente de diferentes fatores de crescimento, e os mecanismos de sinalização do RHAMM intracelular e do RHAMM de superfície (ou CD168) parecem ser diferentes já que ambas são proteínas homólogas entre si e resultantes de "splicing" alternativo (HAYEN et al., 1999; LYNN et al., 2001; DAY E PRESTWICH, 2002; TURLEY et al., 2002).

O RHAMM é capaz de mediar a migração HA-dependente em diversos tipos celulares, incluindo células neuronais. O mecanismo de atuação deste receptor é através de uma cascata de transdução de sinais que leva à fosforilação de tirosinas quinases como, por exemplo, a FAK. Além disso, o RHAMM pode levar a ativação de quinases como ERK, numa via mitógeno-dependente (PDGF), e assim influenciar na expressão de proteínas envolvidas com a tumorigênese, proliferação e motilidade (Figura 15 – página 69). Como foi reportado em alguns trabalhos, a sua ação também pode ser derivada de sua interação com a calmodulina e com os microtúbulos da célula. Além disso, o RHAMM pode agir como co-receptor de proteínas integrais de membrana, e foi descrita a sua ação na formação de adesões focais juntamente com as integrinas (TURLEY et al., 2002).

No cérebro normal, Nagy et al. (1995) mostraram que neurônios são capazes de expressar RHAMM ao longo do comprimento dos neuritos e a migração desses pode ser inibida por anticorpos anti-RHAMM. Em outro estudo, Turley et al. (1994) mostraram a expressão de RHAMM em cultivos primários de astrócitos de ratos recém-nascidos e em

duas linhagens de astrócitos imortalizados. Esta expressão foi encontrada principalmente na superfície das células e no plano de adesão dos astrócitos ao substrato. A imunomarcação de RHAMM nos processos celulares e a habilidade dos anticorpos anti-RHAMM em reduzir a motilidade celular sugerem fortemente um papel dessa proteína na migração de astrócitos. Turley et al. (1993) mostraram ainda que em células ras-transformadas capazes de expressar tanto RHAMM quanto CD44, o RHAMM (e não o CD44) apresenta um papel crucial na migração celular (NAGY et al., 1995; TURLEY et al., 1994; TURLEY et al., 1993; AKIYAMA et al., 2001).

Akiyama et al. (2001) mostraram que células de linhagens de gliomas (U87MG, U251, U343, U373, SF539 e SF188) foram capazes de expressar RHAMM e o gradiente de expressão de RHAMM foi maior nas linhagens mais malignas. O uso de peptídeos diretamente contra o domínio de ligação HA-RHAMM inibiu totalmente a migração destas linhagens tanto em substratos contendo HA quanto em substratos desprovidos desta GAG. Além disso, foi observado que estas linhagens expressaram tanto a proteína de 85 kDa de RHAMM, quanto a proteína de 73 kDa. As expressões dessas duas diferentes isoformas de RHAMM também foram associadas ao grau de confluência das linhagens, dado que conforme se aumentou o grau de confluência, menor era a expressão de RHAMM 85 kDa e maior a de RHAMM 73 kDa. A análise de biópsias de GBMs humanos por esses pesquisadores também evidenciou a expressão forte da proteína de 85 kDa. Além disso, foi observada uma marcação de RHAMM na região astrogliótica, ao contrário de células astrocitárias normais (não-glióticas) que não foram capazes de expressar RHAMM (AKIYAMA et al., 2001).

1.4.3 A invasão

Um passo importante no processo migratório é invasão da MEC circundante. Nesse contexto, as enzimas proteolíticas extracelulares são críticas nas propriedades invasivas de diversos neoplasmas. De fato, na migração de uma célula tumoral há a quebra das barreiras físicas extracelulares compostas por colágenos, elastina, LN entre outros. Diversas evidências *in vivo* e *in vitro* mostraram a produção de proteases por tumores, bem como suas ações no comportamento invasivo de gliomas. Entre as diferentes proteases identificadas em gliomas destacam-se as metaloproteases de matriz, o plasminogênio dependente de uroquinase e a catepsina B.

As metaloproteases de matriz (MMPs) compõem uma grande família de endopeptidases das quais 25 membros já foram descritos. Essa família de proteases é dividida em alguns sub-grupos: (1) metaloproteases de membrana (MT-MMPs), (2) collagenases, (3) gelatinases e (4) estromelisinases. A classificação das MMPs é baseada em suas especificidades por substratos, na similaridade protéica de seus domínios e ainda nas homologias de suas seqüências gênicas. Um fato importante a ser ressaltado é que, as MMPs não estão apenas restritas à degradação da matriz extracelular, na verdade suas funções são muito mais diversas e muitas vezes indiretas como exemplificado na figura 16 (BELLAIL et al., 2004).

Dada a ação degradativa que essas enzimas exercem, é de se esperar que a regulação de suas atividades seja muito controlada. Assim, as MMPs são produzidas pelas células sob a forma de pro-enzimas, e necessitam de uma clivagem proteolítica para serem ativadas. Esse papel é exercido tanto pelas próprias MMPs, como por proteases serina-específicas como a plasmina. Outros reguladores da atividade das MMPs são os TIMPs (ou inibidores de MMPs). Assim como as próprias MMPs, os TIMPs são expressos e então secretados na MEC para exercerem as suas funções inibitórias (BELLAIL et al., 2004).

A super-expressão de MMPs foi relatada em diversas neoplasias e o papel dessas enzimas no metabolismo tumoral já é um consenso na literatura.

Entre a gama de MMPs conhecidas, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 são as mais citadas como tendo papéis na invasão de células de gliomas (SAWAYA et al., 1996). Tanto a MMP-2, quanto a MMP-9 são expressas em linhagens de gliomas humanos e em biópsias de astrocitomas com vários graus de anaplasia. Trabalhos mostraram ainda que as expressões dessas MMPs estão correlacionadas com o grau de malignidade do tumor. Já as atividades de MMP-1 e MMP-3 foram encontradas em gliomas mais malignos, mas em menor escala (NAKAGAWA et al., 1994). As expressões das TIMPs 1 e 2 também estão significativamente reduzidas em gliomas WHO II, III e IV, ao contrário de gliomas WHO I, o que mostra que não apenas as expressões de MMPs, mas também as expressões de TIMPs estão alteradas em tumores cerebrais (MOHANAM et al., 1995; BELLAIL et al., 2004; CHINTALA et al., 1999; KACHRA et al., 1999).

Ao contrário de todas as outras MMPs secretadas, a pro-enzima de MMP-2 é resistente às proteinases solúveis. Ela é convertida na sua forma ativa por um mecanismo dependente das MT-MMPs associadas à superfície da célula (GINGRAS et al., 2000).

Figura 16: Ações indiretas mediadas pelas MMPs. **(A)** Ao clivarem os elementos da MEC, as metaloproteases de matriz podem afetar a sinalização mediada por integrinas e o “crosstalk” com fatores de crescimento. **(B)** Além disso, essas enzimas proteolíticas podem liberar fatores de crescimento que estão aprisionados na MEC, permitindo as suas ligações com receptores específicos. **(C)** A clivagem da MEC também permite a liberação de fragmentos bioativos, ou sítios críticos, capazes de se ligarem a receptores na superfície da célula. **(D)** As MMPs podem ainda liberar ectodomínios de fatores de crescimento aderidos à superfície celular.

Figura 17: Mecanismo de ativação da MMP-2.

O TIMP-2 exerce uma ação inibitória sobre diversas MMPs, mas preferencialmente sobre a MMP-2 sendo capaz de interagir tanto com a MMP-2 ativa, quanto com a MMP-2 latente. A atividade crítica de ativação da MMP-2 via MT1-MMP também depende da interação de TIMP-2 à superfície celular, gerando um receptor heteromolecular para a proenzima de MMP-2. Derugyna et al. (1997) mostraram o papel da expressão de MT-MMPs na ativação MMP-2, os autores transfectaram células de glioma (U251.3) com o gene da MT1-MMP já que *in vitro* não há ativação de MMP-2. A expressão de MT1-MMP permitiu a eficiente ativação de MMP-2 e uma maior mobilidade em diversos elementos de MEC (colágeno tipo I, VN e FN). Além disso, a linhagem foi capaz de se ligar ao C-terminal de MMP-2 via sítios ativos da integrina $\alpha_v\beta_3$ que, por sua vez, apresentou também um papel na ativação de MMP-2. Um esquema da ativação da MMP-2 é apresentado na figura 17 – página 74 (DERYUGINA et al., 1997; CHINTALA et al., 1996b).

Afora seu papel na ativação de MMP-2, as MT-MMPs também apresentam uma atividade proteolítica própria e degradam FN, VN, LN, TN, proteoglicanos, colágenos, entre outros. A ativação das MT-MMPs pode acontecer tanto na superfície da célula, quanto intracelularmente. Exceto pelas MT-MMPs 4 e 6, que são ancoradas à membrana por um glicosilfosfatidilinositol, as outras MT-MMPs apresentam um domínio citoplasmático com funções sinalizadoras específicas. Além disso, essa classe de MMPs pode ser regulada por diferentes citocinas, fatores de crescimento, moléculas de matriz extracelular e por interações com o citoesqueleto (FILLMORE et al., 2001).

Amberger et al. (1994) foram os primeiros a identificarem a expressão de uma MMP ligada à membrana plasmática em uma linhagem de glioma de rato (C6). Posteriormente essa MMP foi confirmada como sendo a MT1-MMP e diversos trabalhos subseqüentes evidenciaram a expressão do RNAm e da proteína de MT1-MMP em tumores cerebrais. Ao contrário do cérebro normal, onde a expressão de MT1-MMP é raramente encontrada em neurônios, células da glia e no endotélio, em tumores ela é muito aumentada. Os astrocitomas com baixo grau de anaplasia, por sua vez, não apresentaram a expressão de MT1-MMP. Os principais sítios de expressão da MT1-MMP foram os astrócitos neoplásicos e, ocasionalmente, as células endoteliais. Mas existem trabalhos que também relacionam a expressão de MT-MMPs em astrócitos reativos e nas células da microglia (AMBERGER et al., 1994; FILLMORE et al., 2001).

Beliën et al. (1999) mostraram ainda um papel indiscutível da MT1-MMP na migração de células de glioma (C6) pela substância branca. De fato, as células de glioma apresentam

uma grande preferência em migrar por fibras mielinizadas, apesar desse substrato ser permeado de proteínas inibitórias para a migração. O MT1-MMP produzido por C6 *in vitro* foi capaz de degradar a mais potente proteína inibitória da mielina (bNI-220) e permitiu a eficiente migração das células em mielina. Já Deryugina et al. (2002) evidenciaram um papel da MT1-MMP na indução da angiogênese de células de glioma humano *in vitro* e *vivo*. Os autores mostraram que células transfectadas para expressarem altos níveis de MT1-MMP, além de apresentarem um aumento de sua proliferação, também apresentaram um intenso processo angiogênico decorrente do aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (FILLMORE et al., 2001; BELIËN et al., 1999; DERYUGINA et al., 2002).

Por outro lado, as expressões dos RNAm de MT2-MMP e MT3-MMP foram menos freqüentes e mais heterogêneas entre os diferentes estudos. Já as expressões das MT-MMPs 4 e 5, que são encontradas no tecido cerebral normal, também são encontradas em astrocitomas de diferentes graus de anaplasia, principalmente GBMs. A expressão do RNAm da MT6-MMP pôde ser encontrada em alguns GBMs, mas sua expressão foi negativa no tecido normal. Os principais estudos de expressão das MT-MMPs foram cuidadosamente revisados por Fillmore et al. (2001).

Trabalhos com hibridização *in situ* e imunohistoquímica mostram que em GBMs humanos a MMP-2 e a MT1-MMP são principalmente expressas pelas células de glioma, mas também podem ser encontradas em neurônios, glia e endotélio; por outro lado a MMP-9 é expressa por células endoteliais em proliferação. Esse fato sugere que a MMP-9 apresenta um papel mais importante na remodelagem angiogênica, enquanto a MMP-2 apresentaria um papel tanto na invasão quanto na angiogênese (BELLAIL et al., 2004; FORSYTH et al., 1999).

Existe uma grande correlação entre a expressão de MMP-2 e MMP-9 e a habilidade do glioma invadir *in vitro*. Linhagens de GBM que são mais invasivas em Matrigel® apresentam também uma maior expressão do RNAm de MMP-2, além de uma maior atividade gelatinase. Inibidores sintéticos da atividade proteolítica de MMP levam a uma redução da migração de células de glioma em Matrigel®. Esses inibidores também são capazes de reduzir a invasão de esferóides de glioma em agregados de células cerebrais fetais em concentrações não citotóxicas. A inibição de MMP-2 por TIMPs naturais e de MMP-9 leva a uma redução das características malignas de células de GBM *in vitro* (BELLAIL et al., 2004).

Os mecanismos pelos quais as MMPs são reguladas e ativadas em gliomas incluem contribuições do padrão genético e estímulos como a hipóxia e reconhecimento dos elementos de MEC. GBMs com a amplificação do EGFR *vIII*, que apresenta uma atividade constitutiva da tirosina quinase de EGFR, demonstram uma maior atividade da MMP-9 ativada. Esse padrão é freqüentemente encontrado em GBMs primários ou *de novo* (CHOE et al., 2002). As transduções de sinais via MAPK/ERK e PI3K são responsáveis pelo aumento da expressão de MMP-9 após a ativação do receptor de EGF e parecem promover a associação da pro-MMP-9 com a superfície celular e a invasão (LAKKA et al., 2002a). A perda de Pten também pode promover a expressão de MMP. Além disso, o HA induziu a expressão de MMP-9 em células de GBM que não apresentaram Pten, mas quando presente o Pten inibiu tanto o MMP-9 induzido, quanto a expressão basal de MMP-2 via ativação das vias de ERK 1 e 2 (PARK et al., 2002). Já Uhm et al. (1996) evidenciaram que a atividade de MMP-2 pode ser modulada pela proteína quinase C (PKC) que em gliomas apresenta uma atividade elevada. Além disso, o TGF β , envolvido na angiogênese, migração e resistência às terapias induz a expressão de MMP-2 e suprime TIMP-2 em linhagens de glioma *in vitro* (WICK et al., 2001). Dada a ação de MMP-9 na habilidade invasiva de GBM, Lakka et al. (2002b) desenvolveram um sistema de inibição do gene de MMP-9 via um antisense mediado por adenovírus. Os autores mostraram uma eficiente inibição da invasão e crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro* (CHOE et al., 2002; BELLAIL et al., 2004; LAKKA et al., 2002a; LAKKA et al., 2002b; WICK et al., 2001; PARK et al., 2002; UHM et al., 1996).

Oliver et al. (2000) mostraram que proteínas da família do bcl-2 (como o bax e o bcl-xl) apresentou um papel na expressão de MMP-9. A família do bcl-2 apresenta propriedades tanto anti-apoptóticas (bcl-2 e bcl-xl), quanto pró-apoptóticas (bax) e a sua expressão foi alterada em gliomas. Os pesquisadores observaram que linhagens de glioma transfectadas para expressarem bcl-2 e bcl-x apresentaram também uma menor expressão de MMP-9, e as células transfectadas com bax expressaram menos TIMP-1. Os autores ressaltaram que o controle do metabolismo migratório envolveu um balanço complexo entre MMPs e TIMPs e a expressão aumentada de TIMP-1 que, apesar de aparentemente paradoxical, também tem sido relatada em diversos tipos tumorais (OLIVER et al., 2000).

As integrinas também são responsáveis pelo controle da expressão de MMPs. Chintala et al. (1996b) mostraram que o tratamento de células de glioblastoma multiforme (SNB19 e U251) com anticorpos anti-integrina $\alpha_3\beta_1$ aumentou a atividade da MMP-2 e induziu a invasão em Matrigel[®]. Já Brooks et al. (1996) demonstraram que a MMP-2 ativa ligou-se diretamente à integrina $\alpha_v\beta_3$ inibindo a migração de células de melanoma em VN. Esses

fatos, conjuntamente, mostraram que a ligação de MMP-2 a receptores de superfície celular pode afetar o reconhecimento, pelas células tumorais, de elementos de MEC específicos e também modificar as respostas celulares induzidas pela MEC (BROOKS et al., 1996 ; CHINTALA et al., 1996b).

Os GBMs contêm regiões hipóxicas, tipicamente associadas às áreas de necrose, que podem ser relacionadas ao aumento da expressão de MMPs e às propriedades migratórias de gliomas. Células de GBM *in vitro* secretam altos níveis de pro-MMP-2 e de MMP-2 ativo, quando em situação hipóxica, e são 60% mais migratórias do que células em situação de normóxia. Em GBMs humanos as células da pseudopaliçada (presentes ao redor das áreas de necrose e em situação de hipóxia) demonstraram uma alta capacidade proteolítica, provavelmente decorrente do aumento da expressão de MMP-2. A indução da migração por hipóxia é dependente da transcrição mediada pelo fator de indução de hipóxia (HIF), assim como pela ativação do proto-oncogene met (BELLAIL et al., 2004).

1.4.4 A angiogênese

A angiogênese é um processo complexo regulado por múltiplos fatores, tanto estimulatórios, quanto inibitórios, que são capazes de modular a proliferação e/ou migração de células microvasculares com o objetivo de formar novos vasos a partir de vasos preexistentes. A angiogênese acontece apenas durante o desenvolvimento, à exceção de certas condições fisiológicas e patológicas. Esse processo envolve diferentes passos altamente coordenados: a produção e secreção de fatores de crescimento, a degradação proteolítica de MEC, com o intuito de permitir a formação do broto do capilar, a proliferação e a migração direcional das células microvasculares e a formação do tubo vascular, com concomitante deposição de membrana basal. No SNC a angiogênese ocorre em diferentes condições hipóxicas e/ou isquêmicas como derrames e processos infecciosos. Além disso, o processo angiogênico apresenta um papel relevante no metabolismo de tumores cerebrais. De fato, os GBMs são considerados um dos tumores primários mais angiogênicos do corpo humano (FISHER et al., 2005).

A neovascularização de gliomas aparentemente não é dependente da "massa crítica" do tumor, já que é inicializada por eventos moleculares e por sinalizações célula-célula nas primeiras 24 horas do crescimento tumoral. Os gliomas são dependentes da angiogênese, mas tal processo parece estar muito mais envolvido com a proliferação, migração e invasão

do que com a oxigenação e nutrição do tumor. Para comprovar este fato, Goldbrunner et al. (1997) implantaram esferóides (200 μ m) de células de glioma humano no córtex de ratos atímicos. Notou-se que os endoteliócitos do hospedeiro migraram para o interior do tumor coalizando-se e formando novos vasos; acrescido a isso a vasculatura do hospedeiro sofreu uma considerável extensão com uma concomitante formação microvascular. O mais surpreendente foi o fato que as células de gliomas passaram então a usar os vasos para migrar, infiltrando-se assim nas estruturas cerebrais adjacentes ao tumor. Convém ressaltar que os endoteliócitos expressam MMPs que podem ser utilizadas para favorecer a invasão do glioma. Além disso, como já foi citado, as células de glioma utilizam a membrana basal dos vasos como sua principal via de disseminação. Aparentemente as células tumorais são capazes de degradar parte da membrana basal secretada por elas próprias, no entanto conservam a membrana secretada pelos endoteliócitos que assim passa a servir como um ponto de ancoramento para o processo migratório (GOLDBRUNNER et al., 1997; GOLDBRUNNER et al., 1998).

Uma grande gama de fatores de crescimento apresenta ação angiogênica no SNC, tanto em neoplasias, quanto em situação de gliose reativa. Entre esses podemos citar o bFGF, o TGF- β 1, o EGF e o PDGF (LOPES, 2003). Auguste et al. (2001), mostraram que a inibição da atividade de FGF levou a uma redução do crescimento de gliomas *in vivo* (C6) por mecanismos tanto angiogênese-dependentes, quanto angiogênese-independentes (LOPES, 2003; AUGUSTE et al., 2001).

No entanto, diferentes trabalhos indicaram que o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) foi o que possuiu o principal papel na angiogênese tumoral. O VEGF constitui uma família de proteínas diméricas glicosiladas entre 34 e 45 kDa que apresentam ação mitótica principalmente sobre células endoteliais. Nos mamíferos o VEGF é o produto de uma família de genes que codificam o VEGF-A, o VEGF-B, o VEGF-C, o VEGF-D e fator de crescimento placentário (PGF). O VEGF-A, o VEGF-B e o PGF são importantes na formação dos vasos sanguíneos, enquanto o VEGF-C e o VEGF-D são essenciais na formação dos vasos linfáticos. Em humanos o “splincing” alternativo do VEGF-A pode gerar o VEGF₁₂₁, o VEGF₁₄₅, o VEGF₁₆₅, o VEGF₁₈₃, o VEGF₁₈₉ e o VEGF₂₀₆. O VEGF₁₂₁ é secretado pelas células enquanto 50% do VEGF₁₆₅ mantém-se aderido à superfície celular; o VEGF₁₈₉, por sua vez, é completamente seqüestrado pela MEC. Aparentemente as funções de cada isoforma na angiogênese são distintas; o VEGF₁₂₁, o VEGF₁₆₅ e o VEGF₁₈₉ estimulam a proliferação e migração de células endoteliais *in vitro*, ao contrário do VEGF₁₂₁ que apresenta uma ação mitogênica 50% menor que das outras isoformas. Estudos

identificaram a expressão das isoformas VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ e VEGF₁₈₉ em gliomas humanos e, similarmente aos tecidos normais, a isoforma VEGF₁₆₅ apresenta-se mais expressa. Um dado interessante ressaltado por Cheng et al. (1997) mostra que em gliomas humanos implantados em camundongos (linhagem U87) as superexpressões de VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ induziram uma hemorragia associada ao tumor (edema), enquanto a superexpressão de VEGF₁₈₉ não (CHENG et al., 1997). Em outro trabalho os autores mostraram que, ao contrário do VEGF₁₆₅ e do VEGF₁₈₉, a expressão de VEGF₁₂₁ foi capaz de induzir a angiogênese e o fenótipo maligno apenas em gliomas implantados no cérebro e não em tumores implantados subcutaneamente (LOPES, 2003; PLATE e RISAU, 1995; GUO et al., 2001; HOMSI e DAUD, 2007).

Os efeitos biológicos do VEGF são mediados por dois diferentes receptores tirosina quinase, o VEGFR-1 (ou Flt-1) e o VEGFR-2 (ou Flk-1/KDR). Outras proteínas podem ainda funcionar como co-receptores de VEGF, como a integrina $\alpha_v\beta_3$, a neuropilina-1 (que liga-se ao VEGF₁₆₅ e ao VEGF₁₄₅), alguns proteoglicanos heparan sulfato e VE-caderinas (CLAESSON-WELSH, 2003). As VE-caderinas apresentam um papel importante no controle da sobrevivência de células endoteliais. No SNC o VEGF-A, Flt-1 e Flk-1 são expressos abundantemente durante a vasculogênese no período embrionário. Por outro lado, essas proteínas são reguladas negativamente no cérebro normal adulto. Diferentes moléculas transdutoras de sinais são ativadas ou modificadas em resposta à estimulação por VEGF-A, dentre elas podemos citar: PI3-K, tirosinas quinase da família das Src, proteína ativadora de Ras GTPase, FAK (quinase de adesão focal), Proteína quinase C, Erk e o mitógeno P38. Uma representação das vias de sinalização induzidas por VEGF-A via Flk-1 é dada na figura 18. O RNAm de VEGF-A foi identificado no cérebro adulto distribuído pelo cérebro (plexo coróide, área postrema e células granulosas do cerebelo), co-localizado com a astroglia e a microglia e no espaço perivascular. Assim, o VEGF-A apresenta uma importância não apenas no desenvolvimento, mas também na manutenção das funções vasculares normais (LOPES, 2003; PLATE e RISAU, 1995).

A expressão de VEGF é induzida por diversos fatores, contudo a tensão de oxigênio parece ser um regulador fino da expressão gênica de VEGF. De fato, trabalhos mostram que tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, há um aumento dramático na expressão de RNAm de VEGF em situações de hipóxia (LOPES, 2003; PLATE e RISAU, 1995). Esta regulação é exercida pela ligação do fator induzido por hipóxia (HIF-1) ao elemento hipóxia-regulado do promotor do gene de VEGF (CLAESSON-WELSH, 2003; DAMERT et al., 1997).

Figura 18: Representação das principais vias de sinalização mediadas pelo VEGF-R2 (EMDBIOSCIENCES, 2006).

Em gliomas de baixo grau há a expressão de VEGF em algumas células, mas em GBMs essa expressão é muito aumentada em alguns sítios tumorais. Enquanto em gliomas de baixo grau o padrão de distribuição remete muito ao cérebro normal, em GBMs há uma elevada densidade vascular e a formação de áreas de proliferação endotelial em glomérulos, com a contribuição de outros tipos celulares como pericitos e células de músculo liso dos vasos (PLATE e RISAU, 1995). Algumas vias que correlacionam a hipóxia e VEGF podem ser vistas na figura 19.

Análises histológicas de GBMs revelaram uma relação grande entre as áreas necróticas do tumor e a expressão de RNAm de VEGF. De fato, as células em paliçada que circundam os focos necróticos dos GBMs são as grandes responsáveis pela produção de VEGF (PLATE et al., 1993). Anteriormente as células em paliçada foram consideradas células de glioma. Contudo, Plate et al. (1994) mostraram que essas células não expressavam antígenos associados à proliferação (como o Ki-67) e hipotetizaram que as células em paliçada eram células de glioma em hipóxia e próximas de entrar em morte celular (PLATE et al., 1994).

Além disso, o VEGF age na permeabilidade vascular *in vivo* o que induz a formação de edema peritumoral. Vaquero et al. (2002) sugeriram um papel dos astrócitos reativos que envolvem o tumor na produção de VEGF/VPF (o VEGF também é conhecido como fator de permeabilidade vascular ou VPF). Esses autores evidenciaram a expressão de VEGF apenas em GBMs humanos que apresentavam edema peritumoral. De fato, Yao et al. (2001) reportaram uma forte correlação estatística entre a presença de edema e a expressão de VEGF em astrocitomas anaplásicos e GBMs. Krum e Rosenstein (1998) evidenciaram ainda a forte expressão de VEGF e Flt-1 em astrócitos reativos induzidos por lesão e também na cicatriz glial induzida por GBM (modelo C6). Por outro lado, as células endoteliais próximas aos sítios de lesão e tumor não apresentaram uma expressão significativa dos RNAm e proteínas dessas moléculas. Esses dados conjuntamente sugerem um papel importante dos astrócitos reativos na angiogênese do SNC adulto (VAQUERO et al., 2002; YAO et al., 2001; KRUM e ROSENSTEIN, 1998).

Yao et al. (2001) correlacionaram a expressão de VEGF e seus receptores com o grau de anaplasia dos gliomas. Os autores mostraram que 94% dos tumores analisados (29 GBMs, 8 astrocitomas anaplásicos e 13 astrocitomas de baixo grau) expressaram VEGF, 52% expressaram Flt-1 e 78% expressaram Flk-1.

Figura 19: VEGF versus Hipóxia. A hipóxia é um potente indutor da expressão de VEGF *in vitro* e *in vivo*. O aumento da secreção de VEGF biologicamente ativo por células expostas a hipóxia é parcialmente decorrente de um aumento da taxa de transcrição deste fator de crescimento. Este aumento decorre da ligação do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) a um elemento responsivo na região 5' do gene de VEGF. O fator de transcrição bHLH-PAS, que interage com o receptor e translocador nuclear Ah (Arnt), e a sua sequência de aminoácidos predita exibem uma alta similaridade ao fator induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α). A expressão do RNAm de HLF está correlacionada com a expressão de RNAm de VEGF. Altas expressões de RNAm de HLF em embriões e organismos adultos sugere que no estado de normoxia o HLF regula a expressão gênica de VEGF, enzimas glicolíticas e etc. A expressão de VEGF é dramaticamente induzida pela hipóxia em grande parte devido a um aumento da estabilidade de seu RNAm. Hur liga-se com alta afinidade e especificidade ao elemento VRS que regula, por sua vez, a estabilidade do RNAm de VEGF. Além disso, um sítio interno ribossomal (IRES) assegura a tradução eficiente do RNAm de VEGF mesmo em situação de hipóxia. O supressor tumoral VHL (von Hippel-Lindau) também regula a expressão de VEGF pós-transcricionalmente (BIOCARTA, 2006).

Além disso, os tumores com uma alta expressão de VEGF também apresentaram uma alta expressão de Flk-1 e esse padrão pôde ser fortemente correlacionado com uma baixa sobrevida dos pacientes. Já Ke et al. (2002) evidenciaram que células de glioma de baixo grau (U251 MG) transfectadas para superexpressarem VEGF apresentaram um aumento em sua tumorigenicidade *in vivo*, induzindo a formação de tumores sólidos e sangrantes.

Outra linhagem de glioma de baixo grau testada pelos pesquisadores (NG-1) não apresentou a mesma resposta, o que mostra que o gatilho para a indução do fenótipo maligno é dependente de uma série de fatores metabólicos e, portanto, de uma predisposição da célula (YAO et al., 2001; KE et al., 2002).

A superexpressão de VEGF em GBMs promove a angiogênese via ligação com os receptores expressos nas células endoteliais, nesse contexto os gliomas de alto grau apresentam uma expressão acentuada de VEGFR-2 (Flk-1) e o VEGFR-1 é expresso em tumores de alto e baixo grau (PLATE e RISAU, 1995). Enquanto o papel de Flk-1 na proliferação endotelial e na permeabilidade vascular é freqüentemente citado, o papel de Flt-1 é menos conhecido. Esse último pode ocorrer tanto na forma solúvel quanto transmembrana e essas variantes são o resultado do “splicing” alternativo do RNAm que os codifica. Apesar de apresentar 10 vezes mais afinidade pelo VEGF que o Flk-1, o Flt-1 apresenta 10 vezes menos atividade tirosina quinase (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997). Assim, a maior parte da atividade biológica de VEGF é mediada pelo Flk-1. Alguns trabalhos sugerem que o Flt-1 teria um papel inibitório na sua forma solúvel, pois seqüestraria o VEGF controlando assim a sua disponibilidade para outros receptores (KENDALL et al., 1996). Além disso, o Flt-1 pode se dimerizar com o Flk-1 inibindo a sua autofosforilação e concomitante sinalização (CLAESSON-WELSH, 2003). Um fato interessante é que camundongos “knockout” para Flt-1 apresentam um crescimento desordenado dos vasos e morrem durante a embriogênese devido a uma superestimulação por VEGF (FONG et al., 1995). Além disso, animais que não apresentam a capacidade tirosina quinase desse receptor desenvolvem-se normalmente (HIRATSUKA et al., 1998). Esses fatos sugerem fortemente uma ação inibitória do receptor Flt-1 na angiogênese e um papel do seu domínio extracelular nesta ação (LAMZUS et al., 2003; FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997; KENDALL et al., 1996; FONG et al., 1995; HIRATSUKA et al., 1998).

Lamzus et al. (2003) buscaram compreender a função do receptor Flt-1 em gliomas humanos. Os autores usaram uma amostra considerável de gliomas (46 GBMs, 14 astrocitomas anaplásicos, 6 oligoastrocitomas anaplásicos, 29 astrocitomas difusos, 5

oligroastrocitomas e 5 tecidos normais) e mostraram que 87% dos tumores apresentavam a expressão Flt-1, sendo que os GBMs apresentavam 12 vezes mais expressão que os astrocitomas anaplásicos. Além disso, os autores observaram uma forte correlação entre a expressão de Flt-1 e a densidade dos microvasos (LAMZUS et al., 2003). Esse resultado levantou um questionamento. Por que a expressão de Flt-1 é aumentada em GBMs, já que esses são mais vascularizados? Teria o Flt-1 uma ação preponderantemente inibitória na angiogênese?

Para responder a essas perguntas os autores ressaltaram que, como outros processos metabólicos, a angiogênese é um balanço de eventos. Assim, a relação entre as expressões de VEGFA e Flt-1 estaria diretamente ligada ao lado para qual a balança pende no processo angiogênico, inibição versus estímulo. Naturalmente essa é uma visão ligeiramente reducionista, dado que diversas outras moléculas co-interagem no processo angiogênico como o FGF e o HGF. Outro fato interessante ressaltado pelos autores foi a relação positiva entre a expressão de Flt-1 e a maior sobrevida dos pacientes. Além disso, os autores identificaram a expressão de Flt-1 também em células tumorais. De fato, muitos outros estudos evidenciaram a expressão desse receptor não apenas em células endoteliais, mas também em melanomas *in vitro* e células hematopoéticas. Em gliomas foi identificada uma imunoreatividade coincidente entre o receptor de EGF e a Flt-1, além disso, foi sugerido que os diferentes subtipos moleculares de células de glioma teriam papéis diferentes na regulação da angiogênese. O Flt-1 solúvel, por outro lado, agiria capturando o VEGF circulante e o protegendo da ação de proteases, além de regular de alguma forma a cascata angiogênica. Um outro fato interessante é a sua habilidade em ligar-se à proteoglicanos heparan sulfato (LAMZUS et al., 2003).

As inibições das atividades dos receptores Flt-1 e Flk-1 têm sido demonstradas em diferentes trabalhos como potenciais terapia anti-tumorais e Geng et al. (2001) evidenciaram que o tratamento de gliomas com um antagonista de Flk-1 reverte o fenótipo apoptose-resistente de células expostas à radioterapia (GENG et al., 2001).

A angiogênese é também um processo invasivo que requer a produção de metaloproteases (MMPs) capazes de regular a ancoragem, a proliferação e a migração de células endoteliais via liberação de fatores de crescimento aprisionados na MEC. Existe uma grande diferença entre as expressões de MMPs nas células endoteliais de diferentes origens; assim o padrão de expressão entre células endoteliais macrovasculares,

microvasculares e células endoteliais específicas da barreira hematoencefálica varia consideravelmente (WAGNER et al., 2003).

Wagner et al. (2003) procuraram estabelecer essas diferenças comparando a expressão de MMP em células endoteliais (cerebrais e de cordão umbilical) sob a ação de diferentes fatores de crescimento (interleucina-10, $TNF\alpha$, FGF) e inibidores. Um fato muito interessante observado pelos autores foi que as células endoteliais cerebrais são muito mais sensíveis aos estímulos externos do que as células de cordão umbilical. Por exemplo, quando expostas a um inibidor de Flk-1, as células endoteliais cerebrais apresentaram uma redução considerável da expressão de MMP-2 e MMP-9 e as umbilicais não. Além disso, em uma co-cultura tridimensional de células endoteliais cerebrais e células de GBM os autores evidenciaram uma intensa capacidade invasiva por ambos os tipos celulares. O bloqueio de Flk-1 reprimiu totalmente a migração das células endoteliais via inibição da secreção de MMP (MMP-2 e MMP-3) mediada por VEGF. Assim, ao induzir a angiogênese o glioma lança mão da habilidade proteolítica das células endoteliais para promover a sua própria invasão e a remodelagem da MEC circundante (WAGNER et al., 2003).

Tanto o Flt-1 quanto o Flk-1 ativam a via tirosina quinase mitógeno-dependente Ras-Raf. Um dos alvos para fosforilação para esta via é o Ets-1 que apresenta um papel fundamental na angiogênese. O proto oncogene que codifica para a família das proteínas Ets também está envolvido no processo de invasão celular. De fato, o Ets regula positivamente a expressão de uPA e collagenase 1 (MMP-1 e MMP-3), uma evidência desse fato é que oligonucleotídeos antisense para ets-1 inibem o comportamento invasivo celular. Os genes de Flt-1 e Flk-1 contêm um elemento responsivo a Ets no seu promotor, portanto Ets está envolvido na regulação da angiogênese mediada por VEGF. Procurando entender o papel do Ets nesses processos citados, Valter et al. (1999) analisaram a expressão do RNAm dessa proteína em gliomas humanos com vários graus de anaplasia. Os autores observaram que o RNAm que codifica para Ets foi encontrado em todos os tumores, mas o aumento da expressão protéica estava restrito aos gliomas mais vascularizados. As células endoteliais ativas apresentaram a expressão de Ets-1 em seu núcleo, enquanto as quiescentes apresentaram essa expressão em seu citoplasma. Foi observada uma alta correlação entre a expressão de VEGF pelas células de glioma e a expressão de Ets-1 pelas células endoteliais. No entanto, como ressaltam os autores, outras vias, independentes de Ets-1 também governam a sinalização mediada por VEGF na angiogênese (VALTER et al., 1999).

O processo angiogênico é antes de tudo um balanço entre eventos estimulatórios e inibitórios. A endostatina é um produto clivado do colágeno XVIII e é um potente inibidor de angiogênese dado que a sua administração em células endoteliais induz a apoptose. Strik et al. (2001) foram os primeiros a identificarem a endostatina em gliomas de rato (C6) e humanos. Esses pesquisadores imunolocalizaram a endostatina em células da microglia, endoteliais, linfócitos e tumorais. Embora cada uma dessas células seja capaz de produzir reguladores de angiogênese, os autores sugerem que não necessariamente a endostatina tenha sido produzida por todas elas, dado que essa proteína é encontrada no sangue circulante e se liga secundariamente às células. Os autores também não encontraram uma correlação entre o grau de anaplasia dos tumores e a expressão de endostatina. Mas Schmidt et al. (2004) evidenciaram uma ação efetiva desse inibidor no tratamento intracraniano, através de bombas osmóticas, na angiogênese e crescimento tumoral. Em um modelo *in vivo* de GBM (U87) o tratamento com 2mg/peso do animal/dia de endostatina inibiu em 73,6% o crescimento do tumor em relação aos controles (STRIK et al., 2001; SCHMIDT et al., 2004).

Uma outra molécula inibidora de angiogênese, a angiostatina, é um produto da clivagem proteolítica do plaminogênio e poderia apresentar um papel na regulação angiogênica de gliomas. Chekenya et al. (2002b) evidenciaram um fato interessante, o proteoglicano NG2 é capaz de seqüestrar a angiostatina e dessa forma permitiria a angiogênese tumoral. Como citado anteriormente, diversos trabalhos evidenciaram a expressão de NG2 em tumores cerebrais (CHEKENYA et al., 2002b).

2 OBJETIVOS

O GBM é considerado o tumor mais letal do corpo humano e até a atualidade não tem cura. A principal razão da baixa sobrevida associada aos GBMs é a alta taxa de reincidência dessa doença que é de quase 100%. Essa reincidência dá-se nas bordas infiltrativas do tumor, no limite com o tecido normal. Células tumorais altamente migratórias e infiltradas no tecido normal não podem ser visualizadas no momento da cirurgia, portanto não são extirpadas juntamente com o tumor pelos neurocirurgiões. Essas células são as principais responsáveis pela reincidência da doença e são muito resistentes à radioterapia e às quimioterapias convencionais. Contudo, como foi abordado na introdução, o ambiente do parênquima cerebral é muito peculiar e oferece uma composição de MEC muito restritiva à migração celular. A maioria das moléculas que facilitam a migração celular está associada às membranas basais dos vasos que são o sítio preferencial de migração desses tumores. Além disso, a presença do tumor leva a uma drástica alteração do ambiente onde este está inserido, seja diretamente ou indiretamente (via indução, por exemplo, da cicatriz glial).

Apesar de diversos autores estudarem a expressão de moléculas envolvidas com o fenótipo proliferativo e migratório de GBMs, poucos se atêm em analisar várias moléculas conjuntamente em um mesmo modelo de GBM. Além disso, poucos se focam especificamente nas células infiltrativas das bordas do tumor e nas células migrando por vasos peritumorais que são as principais responsáveis pela reincidência. Em geral a maioria dos trabalhos generaliza os padrões de expressão das diferentes moléculas analisadas para o tumor como um todo ou analisa poucas moléculas envolvidas com a migração no mesmo modelo. Além disso, os diferentes modelos de GBM atualmente estudados podem ser muito heterogêneos entre si dificultando a comparação dos resultados. As principais abordagens são feitas em linhagens de glioma em cultivo, cultivos primários de tumores humanos, gliomas humanos injetados em camundongos nú e gliomas de rato *in vivo*.

O principal objetivo do presente trabalho foi analisar *in vivo* por imunohistoquímica a distribuição espacial de moléculas envolvidas em diferentes passos da invasão tumoral num mesmo modelo de GBM de rato (C6).

Foram estudadas moléculas envolvidas com cada um dos passos do processo migratório:

- 1- **Elementos de MEC:** VN, FN, TN-C, TN-R, colágeno I, colágeno III, colágeno IV, versican, brevican e agrecan

- 2- **Moléculas de adesão:** CD44, RHAMM, integrina α_v , integrina β_1
- 3- **Enzimas proteolíticas:** MMP-2 e MMP-9
- 4- **Moléculas envolvidas com a angiogênese tumoral:** VEGF, flt-1, flk-1 e COX-2
- 5- **Moléculas indicadoras do grau de diferenciação de tumores cerebrais e marcadoras de cicatriz glial:** B-FABP e GFAP

Deu-se um especial enfoque às **células altamente migratórias das bordas do tumor**, às **células de GBM migrando pelos vasos** e às áreas de **cicatriz glial**.

Comparativamente observou-se ainda a expressão de algumas das moléculas supracitadas em C6 *in vitro* com o objetivo de compreender como o meio extracelular pode interferir no padrão de expressão de moléculas envolvidas com a diferenciação, migração, invasão e angiogênese nesse modelo.

A vantagem do estudo de C6 *in vivo* é a análise da interação do tumor com o tecido cerebral circundante e a possibilidade de análise do tumor como um todo. A imunohistoquímica, por sua vez, permite a análise da distribuição da expressão dessas moléculas nos diferentes setores da neoplasia, respeitando a heterogeneidade característica desses tumores. Essa metodologia ainda é a mais usada atualmente por neuropatologistas para a análise e diagnóstico da doença.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo das células C6

A linhagem C6 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro do Depto. de Histologia e Embriologia da USP. As células foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 50U/ml, streptomycin 50 µg/ml). Os frascos foram mantidos em estufas de incubação com atmosfera de 5% de CO₂ e 95 % de ar à 37°C até atingirem a fase exponencial de crescimento. O congelamento das células foi feito em meio suplementado com 10% de soro e com 20% de glicerol.

3.2 Preparo das células C6 para as reações imunohistoquímicas *in vitro*

Para a realização das imunohistoquímicas *in vitro* as células C6 foram cultivadas sobre lamínulas em placas de cultivo de 24 poços. Foram semeadas 2×10^4 células por poço e os experimentos foram realizados com as células crescidas por 2 dias e por 3 dias. Após o tempo de crescimento o meio de cultivo foi retirado e as células lavadas delicadamente com PBS. As monocamadas de células foram fixadas com formaldeído 4% em tampão fosfato (0,1M – pH 7,2 à 7,4) por 30 minutos em geladeira, e então lavadas com PBS. Foram realizados 5 experimentos com um n mínimo de 3 lamínulas por molécula analisada para cada experimento.

3.3 Implante das células C6 em ratos

Inicialmente as ratas Wistar adultas (250-350g) foram anestesiadas com injeções intramusculares de quetamina:xilazina (10 mg : 1,5 mg /100g de peso corporal). Mas um segundo procedimento de anestesia foi utilizado para os grupos de animais tratados com ácidos poliinsaturados onde administrou-se a quetamina: xilazina (11,5 mg : 0,4 mg /100g de peso corporal) intraperitonealmente. O osso craniano foi cuidadosamente perfurado com

uma broca odontológica e foram injetadas estereotáxicamente 5×10^5 células C6 (suspensas em salina) no Striatum esquerdo dos animais. O volume máximo de injeção usado para cada animal foi de 5 μ l. As coordenadas da injeção foram: +0.48 mm bregma, médio-lateral = 3 mm e dorso-ventral = 5,4 mm de acordo com o mapa estereotáxico de Paxinos & Watson (1998). Uma imagem ilustrativa do sítio de injeção do tumor C6 é dada na figura 20.

Para o projeto foi padronizado um tempo de 28 dias para o crescimento dos gliomas nos animais. Neste período observou-se que o tumor já apresentava diversas características de um glioblastoma multiforme (como áreas de necrose e capacidade infiltrativa) sem interferir visualmente nas capacidades cognitivas e motoras dos animais. Os ratos responderam bem às cirurgias e não apresentaram sinais de dor ou perda de peso. Foi constatada apenas uma morte em decorrência do procedimento cirúrgico que foi resultante de um sangramento no local da injeção como pôde ser constatado na necropsia posteriormente realizada. O procedimento apresenta aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo número 190/02).

Figura 20 - (A) Representação de alguns pontos referenciais para a injeção estereotáxica em ratos Wistar adultos. As coordenadas são calculadas a partir do bregma que representa a intersecção das suturas cranianas. Os animais são imobilizados na mesa estereotáxica na altura da linha interaural e abaixo dos dentes incisivos. (B) Prancha representativa das estruturas cerebrais presentes num corte feito 0,48 mm à frente do bregma. As coordenadas dorso-ventral (3 mm) e médio-lateral (5,4 mm) usadas permitem a injeção das células exatamente no centro do Striatum do animal (ilustrações de PAXINOS e WATSON, 1998).

3.4 Retirada e fixação dos encéfalos

Após o tempo de crescimento dos tumores os animais foram anestesiados e mortos por perfusão transcardíaca. Para a perfusão uma cânula foi inserida no ventrículo esquerdo do animal e fixada na aorta com uma pinça. O átrio direito foi aberto permitindo a circulação intravascular de 200ml de salina (0,9% NaCl) para a substituição de todo o sangue. A injeção de 0,1 ml de Liqueimine[®] (heparina sódica) foi usada previamente à introdução da cânula com o intuito de minimizar a coagulação do sangue e, portanto, baixa eficiência da perfusão. Após a lavagem com salina, 600ml de formaldeído 4% em tampão fosfato (0,1M – pH 7,2) foram usados para a fixação. Os encéfalos foram então cuidadosamente retirados e pós-fixados por 4 horas com o mesmo fixador utilizado na perfusão. Para os cortes em congelação esses encéfalos foram crioprotetidos em sacarose 20% (em tampão fosfato 0,1M – pH 7,2) “overnight” ou até os encéfalos terem afundado na solução (a alteração da densidade do tecido é um eficiente indicativo da total substituição do fixador pela solução crioprotetora de sacarose). Os cérebros foram cortados em um micrótomo de congelação (Leica SM 2000R) e montados um a um sobre lâminas previamente gelatinizadas. Após o corte e montagem dos encéfalos, as lâminas foram mantidas em estufa (entre 40°C e 50°C) por duas horas para garantir a eficiente aderência dos cortes. Todos os cortes obtidos (entre 20 e 100 cortes por animal) foram conservados em freezer. Optou-se por conservar as lâminas em freezer a fim de aumentar a vida útil dessas para os experimentos.

Uma foto-montagem dos passos as cirurgia de implante do tumor C6 é dada na (próxima página).

Foto 1: Cirurgia de implante do tumor C6: A- Animal posicionado na mesa estereotáxica, B- Incisão na pele da cabeça do animal, C- Identificação do bregma, D e E- Posicionamento do sistema de injeção para calibração da mesa estereotáxica segundo a posição do bregma do animal, F- Perfuração do osso craniano após a medição da posição do sítio de injeção, G e H- Injeção das células C6 no Striatum do animal.

Para o processamento em parafina os encéfalos foram desidratados em etanol (30 min – álcool 50%, 30 min – álcool 60%, 30 min – álcool 70%, 30 min – álcool 80%, 1h30min – álcool 95%, overnight – álcool absoluto), diafanizados em xilol (dois banhos de 1h30min à 60°C) e infundidos em parafina (dois banhos de 3 horas em parafina) antes de serem incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo Leica (RM 2145), os cortes (5µm) foram montados em lâminas gelatinizadas e esticados em uma estufa à 60°C por 2 horas. O material emblocado em parafina foi usado principalmente para reações de hematoxilina-eosina com o intuito de analisar a morfologia do tumor. Neste caso os cortes dos encéfalos de ratos foram imersos em colódio (diluído em éter dietílico) antes do procedimento com o intuito de evitar que desprendessem. Foi utilizado um procedimento padrão de coloração por hematoxilina-eosina.

3.5 Corte e montagem das peças de tumores humanos

Os dois espécimes de astrocitomas humanos aqui apresentados (ambos glioblastoma multiforme) foram obtidos da clínica particular do Dr. Paulo Henrique Pires de Aguiar. Os espécimes foram reavaliados por um neuropatologista e fornecidos em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo Leica (RM 2145), os cortes (5 µm) foram montados em lâminas gelatinizadas e esticados em uma estufa à 60°C por duas horas. As lâminas de tumores humanos foram previamente desparafinizadas com xilol (30 minutos à 60°C e 20 minutos à temperatura ambiente) e hidratadas como de rotina. Os procedimentos que se seguiram foram similares àqueles aplicados aos criocortes de cérebro de rato.

Convém ressaltar que as imunomarcações desses espécimes foram apenas ilustrativas no trabalho como um todo já que o número experimental de GBMs humanos obtido foi muito pequeno.

3.6 Reações imunohistoquímicas

As lâminas montadas com criocortes foram hidratadas (3 vezes em água destilada) por no mínimo 40 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 30 min com H₂O₂ (2%) em metanol/H₂O (1:1) seguido por diversas lavagens (3 vezes H₂O destilada + 3 vezes PBS). Para alguns dos anticorpos foi necessária uma digestão com tripsina neste

ponto do procedimento. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com uma solução 2% BSA / 2% do soro do animal onde foi feito o anticorpo secundário em PBS –Triton X-100 (0,2%). Os cortes foram então incubados “overnight” com os respectivos anticorpos primários diluídos em PBS-Triton 0,2% à temperatura ambiente. As descrições dos anticorpos usados neste trabalho e as suas respectivas concentrações estão sumarizadas nas tabelas 3, 4 e 5. 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 o 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/100ml + 1ml H₂O₂ 3%). As lâminas foram deixadas na solução de revelação entre 2 e 10 minutos e os núcleos foram contra-corados com metil-green 0,1%. Depois de desidratadas em um gradiente crescente de etanol as lâminas foram montadas com Permount®.

Para a eficiente imunomarcagem de alguns anticorpos foi necessária a exposição dos epítomos a serem reconhecidos pelos anticorpos. Baseado em descrições da literatura procurou-se expor os epítomos através de microondas. As lâminas foram incubadas em um tampão citrato (1 volume de solução de ácido cítrico 0,1M para 1 volume de solução de Na₂HPO₄ 0,2M) e expostas às microondas (potência alta) por no mínimo 60 segundos. Foram testadas diferentes potências e tempos de exposição. Infelizmente os cortes não foram capazes de se manterem aderidos às lâminas. Esta metodologia de exposição de sítios é particularmente utilizada para a exposição de epítomos de proteoglicanos como o versican, agrecan e brevican aqui estudados. A metodologia mais eficiente na exposição de epítomos foi a digestão com tripsina. Apesar de diferentes trabalhos da literatura terem sugerido o uso de tripsina em concentrações entre 0,05% e 0,1%, no material aqui estudado esta concentração foi muito agressiva para os cortes. A tripsina foi utilizada na concentração de 15mg/100ml em tampão tris-base (20mM – pH 7,8) com CaCl₂ (0,1%). Essa solução estoque de tripsina foi diluída 1:10 em água destilada. Foi padronizado um tempo de 7 minutos de incubação dos cortes em tripsina à temperatura ambiente. Para as imunohistoquímicas *in vitro* não foi realizada digestão com tripsina.

Um fato importante a ser ressaltado é que em cada bateria de imunohistoquímicas (onde são realizadas as imunomarcações de diversas moléculas) foram utilizados cortes seriais próximos. Assim, tem-se a marcação de diferentes moléculas em regiões próximas e

seqüenciais do tumor. Um outro fato a ser citado é que por serem cortes coronais, foi possível observar-se no mesmo corte tanto o hemisfério cerebral com tumor, quanto o hemisfério normal. Isso tornou possível a identificação eficiente de controles positivos dentro das próprias lâminas experimentais.

Dado que muitas reações apresentaram uma marcação quase imperceptível, buscou-se metodologias para a intensificação da reação. A incubação das lâminas em uma solução de ósmio (0,04% por 30 minutos) após a revelação com DAB mostrou-se muito eficiente e foi adotada para a maioria dos anticorpos. O ósmio é um metal pesado que, assim como cobalto, apresenta uma afinidade de ligação com a 3,3'- diaminobenzidina (DAB) o que torna a reação enegrecida. Contudo, um cuidado maior na análise das imagens precisou ser tomado dado que o ósmio também reage com as fibras mielinizadas do encéfalo produzindo uma nítida marcação de fundo. As reações *in vitro* não foram intensificadas com ósmio. Nos resultados todas as reações intensificadas com ósmio foram apropriadamente identificadas.

Tabela 3 - Descrição dos anticorpos primários usados

Anticorpos primários	Código de Referência	Animal onde foi produzido	Tipo	Origem
CD44 (H-CAM)	H-300	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	H62	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
GFAP	C19	Cabra – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
MMP-2	C19	Cabra - policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
MMP-9	C20	Cabra – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
TN-C	F17	Cabra – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
TN-R	N20	Cabra – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
VN-65	H270	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
VEGF	A20	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
FIt-1	C17	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Flk-1	C1158	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Integrina β_1	M106	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Integrina α_v	AB 1930	Coelho – policlonal		Chemicon
Colágeno I	M19	Cabra - policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Colágeno III	C15	Cabra - policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Colágeno IV	H234	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Brevican	C20	Cabra - policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Versican	T20	Cabra - policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
Agrecan	D20	Cabra - policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
PCNA	-	Camundongo - policlonal	IgG	Chemicon
FN	H300	Coelho – policlonal	IgG	Santa Cruz Biotechnology
RHAMM (hum)**	-			Doação **
RHAMM (rato)**	-	Coelho – policlonal	IgG	Doação **
B-FABP*	-	Coelho – policlonal	IgG	Doação *

* Anticorpo gentilmente doado por Dr. Jacques H. Veerkamp (University Medical Center Nijmegen, The Netherlands).

** Anticorpo gentilmente doado por Dra. Eva Ann Turley (University of Western Ontario, Canadá).

Tabela 4 - Descrição dos anticorpos secundários usados

Anticorpo secundário	Animal onde foi produzido	Origem
Anti-coelho	burro	Santa Cruz Biotechnology
Anti-cabra	burro	Santa Cruz Biotechnology
Anti-camundongo	cabra	Chemicon

Tabela 5 - Concentrações dos anticorpos primários usados

Anticorpos primários	Concentração em Tumores de Rato	Concentração em C6 em Cultivo	Concentração em Tumores Humanos	Tripsina (<i>In vivo</i>)
CD44 (H-CAM)	1:200	1:200	1:200	não
COX-2	1:200	1:400	1:200	não
GFAP	1:300	1:500	1:300	não
MMP-2	1:100	1:300	np	não
MMP-9	1:200	np	1:200	não
TN-C	1:200	1:200	1:200	não
TN-R	1:300	1:300	1:300	não
VN-65	1:100	1:200	1:100	sim
VEGF (165)	1:200	1:200	1:200	não
Flt-1	1:100	1:300	1:100	não
Flk-1	1:100	1:300	1:100	não
Integrina β_1	1:100	np	np	sim
Integrina α_v	1:300	np	np	sim
Colágeno I	1:100	1:200	1:100	sim
Colágeno III	1:100	1:200	1:100	sim
Colágeno IV	1:100	1:200	1:100	sim
Brevican	1:100	1:300	1:100	sim
Versican	1:100	1:100	1:100	sim
Agrecan	1:100	1:300	1:100	sim
FN	1:200	1:200	1:200	não
RHAMM (rato)	1:500	1:500	np	não
B-FABP	1:500	1:500	1:500	não

Para facilitar a visualização dos tumores como um todo foram montadas imagens (foto-montagens) no programa gráfico CorelDraw 11. As foto-montagens facilitaram a comparação com os controles negativos das reações. Após as montagens as imagens (salvas em alta resolução 300dpi, 80x80 cm) foram analisadas na tela do computador com o intuito de preservar ao máximo as intensidades de marcação e uniformizar as comparações (observação: a impressão das imagens altera as cores e contrastes).

Os graus de imunomarcacão selecionados foram:

(+++)
fortemente marcado

(++) moderadamente marcado

(+) fracamente marcado

(+/-) marcação heterogênea

(-) marcação ausente

(no) parâmetro não observado

Os GBMs analisados foram ainda divididos em setores respeitando suas características morfológicas. Os setores estudados foram: o centro do tumor, as bordas do tumor, as áreas proliferativas, os vasos peritumorais e tumorais, as células em paliçada, as áreas de necrose, a cicatriz glial induzida pelo tumor e as células associadas a vasos peritumorais.

Setores do tecido normal também foram analisados para a imunomarcação das diferentes moléculas estudadas como os vasos normais, o tecido normal ao redor do tumor e o tecido normal do hemisfério contralateral à injeção.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica do modelo C6 implantado

O maior objetivo do presente projeto foi a caracterização em um único modelo animal de diversas moléculas envolvidas em diferentes pontos chave da migração dos gliomas. Esse tipo de análise é muito rara na literatura, grande parte dos trabalhos se focam em um aspecto único em suas análises como, por exemplo, apenas a degradação da MEC, ou ainda as subunidades de integrinas produzidas pelo tumor. Outros trabalhos, por sua vez, analisam a expressão gênica generalizada do tumor (por exemplo, trabalhos de “gene array”) com o intuito de identificar marcadores para os diferentes graus de anaplasia, mas sem focar em uma pergunta específica do metabolismo tumoral. O maior problema desses trabalhos é que os autores não contextualizam e relacionam as moléculas analisadas apropriadamente, dada a plethora de ações que cada molécula pode ter no metabolismo celular (LIANG et al., 2005).

Outro fato importante a ser ressaltado é que o modelo *in vivo* aqui estudado (C6) é derivado de uma linhagem cultivada. O cultivo de células sempre deve ser analisado cuidadosamente em trabalhos comparativos, pois células em cultivos tendem a perder as suas características especializadas e a sofrer uma alta seleção. No caso específico de células tumorais essa seleção de clones, inerente a qualquer cultivo, pode alterar as características do tumor implantado *in vivo*, o que algumas vezes pode invalidar as análises comparativas entre dois trabalhos independentes que usaram a mesma linhagem tumoral. Assim, uma análise extensa da expressão protéica em um modelo único e com estoques de células de mesma origem é a única forma de se analisar o comportamento específico do tumor que está sendo estudado.

A linhagem C6 é derivada de culturas de explantes tumorais de ratos Wistar expostos à metil-nitrosurea, um potente carcinógeno indutor de tumores cerebrais (PARSA et al., 2000). Essas células têm sido usadas na investigação da migração e invasão *in vitro*, no estudo da permeabilidade da barreira hemato-encefálica e no estudo de diferentes modalidades de quimioterapia, radioterapia e terapia gênica.

Com o intuito de analisar a expressão e distribuição espacial das moléculas envolvidas com os processos migratórios/invasivos do modelo de GBM de rato C6 padronizou-se um tempo ideal de crescimento do tumor pós-injeção estereotáxica. Procurou-se estipular um tempo tal que não interferisse nas capacidades cognitivas e

motoras dos animais, mas que permitisse a identificação no tumor de eventos migratórios e invasivos. Foi observado que para este modelo *in vivo* os tumores já apresentavam muitas das características típicas de um glioblastoma multiforme como: bordas infiltrativas, áreas de necrose, atipias nucleares, intensa angiogênese e altíssima capacidade invasiva nas estruturas cerebrais a partir de 14 dias pós-injeção. Foram testados animais com tumores crescidos por até 30 dias e neste período não foram observadas influências deletérias do tumor sobre a saúde geral dos animais. Para o trabalho foi selecionado um tempo total de 28 dias de crescimento do tumor, contudo, para as análises morfológicas das características tumorais foram usados tanto cortes em parafina de (7 animais com 21 dias de crescimento do tumor), quanto criocortes (5 animais com 20 dias de crescimento do tumor). Ambos os materiais foram corados com hematoxilina e eosina.

Histologicamente os GBMs humanos são compostos por células fusiformes, arredondadas ou pleomórficas pouco diferenciadas. As células apresentam muitas vezes núcleos grandes e hipercromáticos e mesmo sendo típica a presença de células gigantes multinucleadas, a sua obrigatoriedade não está necessariamente associada com o desenvolvimento de um estado clínico mais maligno. A atividade mitótica destes tumores é bem elevada. A hiperplasia vascular é nítida, dada a alta capacidade angiogênica tumoral. Os GBMs apresentam também diversos focos necróticos que são circundados por células tumorais alinhadas chamadas de células em paliçada. Os focos necróticos são decorrentes do crescimento acelerado do tumor que também apresenta uma alta capacidade invasiva. Além disso, as bordas do tumor são muito difusas o que torna impossível a diferenciação do tecido tumoral versus tecido normal. A **prancha 1** mostra algumas dessas características citadas em GBMs humanos corados com hematoxilina-eosina.

No modelo C6 aqui estudado foram observados vários destes padrões morfológicos (**Pranchas 2, 3 e 4**) o que caracterizaria o modelo experimental como um glioblastoma multiforme. O tumor apresentou um crescimento muito acelerado nos animais e a formação de focos necróticos circundados por células em paliçada. A hipercelularidade do tumor permitiu a sua fácil identificação mesmo a olho nu, descartando a necessidade do uso de marcadores para as células implantadas (como p.e a dextranamina biotinilada-FITC e o *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin). Uma característica observada nos tumores implantados foi a sua altíssima capacidade angiogênica. Mesmo após a perfusão eficiente dos animais foram observadas hemácias nos vasos tumorais, o que não foi observado nos vasos normais já que mesmo os diminutos capilares adjacentes ao tumor não apresentaram o acúmulo de hemácias. Este fato é condizente com a natureza caótica de desenvolvimento

dos vasos neoformados em tumores sólidos (**Prancha 4**). O pequeno acúmulo de hemácias no tumor acabou por facilitar em muito a sua visualização macroscópica, dado que muitos dos tumores apresentaram uma coloração avermelhada. Baseados nos padrões de expressão de vários genes em diferentes linhagens de glioma de rato (C6, 9L, F98 e RG2), Sibenaller et al. (2005) mostraram que a linhagem C6, apesar de não ser a linhagem morfológicamente mais semelhante aos GBMs humanos, apresentou-se como a linhagem com maior similaridade genética a esses tumores (SIBENALLER et al., 2005).

Outra característica observada nos tumores C6 *in vivo*, foi a presença de células intensamente pigmentadas. A observação do material evidenciou que as células do glioma C6 apresentam um “cromógeno” indeterminado distribuído não uniformemente por seus citoplasmas, que confere às células uma cor marrom-esverdeada intensa. A **prancha 4** apresenta imagens desses tumores não processados (apenas hidratados e montados sobre lâminas após o corte) e com os núcleos contracolorados com metil-verde. Observou-se que apenas uma parcela dos tumores observados apresentou essas células “coloridas”. Em outros gliomas C6 as células com pigmento foram encontradas próximas às bordas infiltrativas, no limite com o tecido normal. Aparentemente essas populações de células C6 são especialmente migratórias e invasivas. Durante a realização das imunohistoquímicas essa cor intrínseca das células foi muito reduzida principalmente por causa da pré-incubação das lâminas com H₂O₂, que apresenta propriedades descolorantes e é usada para o bloqueio da peroxidase endógena. No entanto, a incubação em 3’3-Diaminobenzidina (DAB) pareceu intensificar a cor dessas células “coloridas”, o que poderia mascarar algumas imunoreações específicas. No caso das células que expressavam pigmento isso foi um problema, pois muitas vezes a marcação com DAB era indistinguível da marcação inespecífica resultante da cor intrínseca das células. Por esse motivo, alguns animais precisaram ser descartados das análises e uma observação muito mais rigorosa foi feita na comparação dos controles negativos das reações com as reações *per se*. Infelizmente não foi encontrada nenhuma referência na literatura da provável natureza desse pigmento observado.

Macroscopicamente os tumores C6 apresentaram uma alta habilidade invasiva e infiltrativa. Diversos tumores apresentaram uma capacidade migratória preferencial por fibras mielinizadas (principalmente o corpo caloso), outros se desenvolveram ao redor do foco central do sítio de injeção e outros ainda foram capazes de invadir eficientemente o parênquima cerebral formando extensões tumorais (**Prancha 5**). Foram observados ainda animais com tumores multicêntricos, isto é, com mais de um foco tumoral.

4.2 Imunomarcção de GFAP e B-FABP como indicadores indiretos do grau de diferenciação dos tumores C6 *in vivo*

O modelo implantado C6 aqui estudado não expressou GFAP significativamente como pode ser visto na prancha 6. A proteína acídica fibrilar glial (ou GFAP) é um filamento intermediário citoplasmático de 50 kDa usado como marcador astrocítico. As funções deste filamento intermediário ainda não foram totalmente elucidadas, mas sabe-se hoje que esta proteína além de apresentar um papel na organização do citoesqueleto, também interfere na manutenção da mielinização, na adesão celular, nas interações astrócitos-neurônios e em vias de sinalização relacionadas ao crescimento e à diferenciação celular. A sua expressão é observada tanto em astrócitos normais quanto em processos patológicos como a cicatrização glial e tumores gliais. A imunodeteção de GFAP em células neoplásicas identifica o tumor como um glioma, mas não necessariamente de origem astrocítica. Em geral, células tumorais morfológicamente similares a astrócitos são fortemente marcadas para GFAP, enquanto as células pequenas não diferenciadas e as células gigantes multinucleadas tendem a apresentar pouca ou nenhuma reatividade para este filamento intermediário. Diferentes trabalhos mostram que a produção de GFAP é progressivamente perdida conforme aumenta o grau de malignidade do tumor. Toda et al. (1994 e 1999) mostraram que o crescimento de tumores de células C6 transfectadas com cDNA de GFAP foi muito reduzido em camundongos atímicos quando comparado às células transfectadas apenas com o gene de resistência à neomicina. Estes resultados sugerem que o GFAP apresenta-se como um regulador crítico do crescimento de astrocitomas. A linhagem C6 de glioma de rato sabidamente expressa tanto marcadores gliais quanto marcadores de oligodendrócitos. O que poderia sugerir sua origem a partir de células nervosas progenitoras (SHOSHAN et al., 1999). Além disso, diferentes estudos mostraram que esta linhagem apresenta uma expressão variável de GFAP. Contudo, o estoque por nós usado no presente trabalho não expressou GFAP significativamente *in vivo* (**imagens C, D, E e F da prancha 6**), o que poderia sugerir um fenótipo menos diferenciado e, portanto, mais maligno (RUTKA et al., 1997; YANG et al., 1994; LI et al., 1993B; TODA et al., 1999; TODA et al., 1994; KLEIHUES et al., 1995; SALERO-COCA et al., 1995; BRODIE et al., 1998; RAMOS, 2002).

A alta expressão de GFAP por astrócitos reativos é uma característica da gliose astrocítica e a inibição de sua produção pode interferir na formação da cicatriz glial, importante para o restabelecimento da barreira hematoencefálica. A imunodeteção de

GFAP no modelo de C6 implantado permitiu a precisa localização das regiões de cicatrização glial em todos os tumores analisados (**Prancha 7**). Além da forte expressão de GFAP no entorno do sítio de injeção, região onde houve um estresse mecânico decorrente da inserção da agulha, pôde-se observar uma expressão alta desta proteína circundando todo o tumor, mesmo em locais muito distantes do sítio de injeção ou em “braços” de tumor infiltrados no tecido normal. Este fato sugere que o tumor *per se* também é capaz de induzir a ativação dos astrócitos reativos. Como é sabido, GBMs induzem uma quebra da barreira hematoencefálica. Nagashima et al. (2002) evidenciaram pela análise imunohistoquímica de sete cérebros com GBM obtidos por necropsia que há uma alta expressão de GFAP, MMP-2, MT-MMP e VEGF na glia que circunda os tumores. Estes fatos sugerem que a periferia do tumor apresenta processos ativos de remodelação vascular e da MEC que são condizentes com aqueles observados na gliose reativa (NAGASHIMA et al., 2002). A comparação entre as expressões de GFAP no tecido cerebral normal, que se apresentou baixa, e na região da cicatrização glial dão uma idéia da forte regulação positiva que esta proteína apresenta nos astrócitos reativos (ver imagem B da prancha 6 comparativamente às imagens C a H da mesma prancha).

Outra proteína analisada no modelo C6 foi a proteína ligante de ácidos graxos do cérebro (B-FABP). A família multigênica das FABPs consiste de proteínas estruturalmente similares que apresentam padrões celulares e teciduais característicos. Apesar das suas funções ainda serem focos de discussões, sabe-se que estas proteínas têm um papel na captação, armazenamento e direcionamento de ácidos graxos e retinóides. Assim como outros representantes da família das FABPs, a B-FABP é expressa tanto no núcleo quanto no citoplasma das células. Esta proteína tem um papel na disponibilização de ligantes para o núcleo da célula levando a uma modulação da expressão de genes relacionados tanto com o metabolismo lipídico, quanto com o crescimento celular e diferenciação. Durante o desenvolvimento do SNC de murinos a B-FABP é primeiramente expressa nas células neuroepiteliais precursoras e tardiamente nas células da glia radial e em astrócitos imaturos. No cérebro adulto, por sua vez, a B-FABP restringe-se às células da limitante externa da glia, às células gliais radiais do giro denteado do hipocampo, às células da glia de Bergmann e ao bulbo olfatório. A inativação da B-FABP por anticorpos leva a uma inibição da diferenciação de neurônios e de células da glia do cerebelo. Este fato sugere que esta proteína teria um papel no estabelecimento do sistema de fibras da glia radial que é indispensável para a migração dos neurônios imaturos durante o desenvolvimento. Dada a sua expressão finamente regulada durante o desenvolvimento, a B-FABP tem sido usada

como um marcador de astrócitos imaturos no cérebro adulto (KURTZ et al., 1994; GODBOUT et al., 1998; BISGROVE et al., 2000; GLATZ e VAN DER VUSSE, 1996).

O modelo C6 foi capaz de expressar a B-FABP como pode ser visto na **prancha 8**. Essa expressão foi heterogênea com algumas células expressando níveis mais elevados de B-FABP. No entanto, todas as células aparentam expressar ao menos uma pequena quantidade desta proteína. A expressão de B-FABP pelo tumor implantado C6 poderia sugerir uma natureza menos diferenciada das células, dado que este ligante de ácidos graxos é preponderantemente expresso por astrócitos imaturos. Contudo, a função do B-FABP no metabolismo de gliomas ainda é desconhecida. Foi observada ainda uma expressão uniforme de B-FABP no tecido cerebral normal das lâminas analisadas. Dadas as evidências da literatura, acredita-se que os neurônios não são capazes de expressar B-FABP em cérebros de murinos adultos, no entanto, alguns astrócitos do SNC adulto expressam baixos níveis de B-FABP em seus corpos celulares (KURTZ et al., 1994). As análises dos resultados da expressão de GFAP e B-FABP levam à conclusão que o modelo aqui utilizado apresenta uma natureza provavelmente menos diferenciada, sugerindo um fenótipo mais maligno.

Nas células C6 *in vitro* ambas as moléculas, GFAP e B-FABP, apresentaram um padrão de expressão similar àquele observado *in vivo* (**Prancha 9**). A expressão de GFAP *in vitro* se mostrou presente, porém reduzida, ao contrário da expressão de B-FABP que foi muito elevada.

Além disso, foram analisados 3 GBMs humanos em caráter ilustrativo com o intuito de comparar os padrões de expressão entre o modelo de GBM de rato (C6) e os tumores humanos. As análises da expressão de ambas as moléculas em GBMs humanos foram similares àquelas observada no modelo de GBM de rato C6. Como pode ser visto na **prancha 10**, o GFAP foi expresso pelo tumor, mas não por todas as células, novamente indicando uma perda das suas características astrocíticas. O padrão de marcação pareceu seguir os prolongamentos astrocíticos formando longas extensões. O B-FABP por sua vez foi fortemente expresso pelos tumores analisados e, assim como observado para C6, algumas células apresentaram uma expressão mais intensa. Em ambos os casos foram analisadas áreas de alta celularidade onde havia a predominância de células de glioblastoma multiforme.

4.3 Imunodeteção de elementos de matriz extracelular

4.3.1 Glicoproteínas adesivas TN-R e TN-C

Como citado na introdução, a MEC do SNC de mamíferos tem um papel indispensável em processos como a migração, a sobrevivência de neurônios, a diferenciação, o crescimento axonal, entre outros. No SNC grande parte das interações das células com esta MEC são mediadas por receptores como o CD44, integrinas e membros da família dos N-CAMs. Da mesma forma, muitas características relevantes dos gliomas malignos, como a natureza invasiva e migratória alta, são dependentes das interações celulares com estes elementos de MEC. Os astrocitomas malignos e GBMs apresentam uma nítida preferência por migrar ao longo dos vasos sanguíneos em virtude da presença de uma MEC (como colágenos e glicoproteínas adesivas) mais permissível à movimentação celular. Embora não sejam hábeis em penetrar a membrana basal destes vasos são muito eficientes em migrar no espaço perivascular. Assim, dada a pobreza de elementos de MEC fibrilares no SNC muitos tumores apresentam a capacidade de expressar e modificar a sua própria MEC. Diversos trabalhos mostram que a TN-C, apresenta uma expressão elevada em tumores gliais e a alta expressão desta glicoproteína, que se apresenta quatro vezes mais expressa em GBMs do que em tecidos normais, pode ser relacionada com o grau de malignidade do tumor. Herold-Mende et al. (2002) citam ainda que a expressão de TN-C parece tornar-se mais heterogênea com o aumento do grau de anaplasia do glioma. Este fato é especialmente intrigante dado que o cérebro normal adulto de mamíferos quase não apresenta a expressão de TN-C (vide introdução) que apresenta um papel indispensável durante a morfogênese, período este de alta migração das células precursoras (KIM et al., 2000; HEROLD-MENDE et al., 2002).

Além disso, tem sido proposto que os elementos de MEC associados aos tumores gliais são produzidos tanto pelas próprias células tumorais, quanto pelas células do estroma do tecido normal e induzidas por sinais tumorais. De fato, as células vasculares como as células endoteliais e células de músculo liso vascular estão diretamente implicadas na neoangiogênese associada aos GBMs. Zagzag et al. (1996) mostraram por microscopia eletrônica (imuno-ouro) e hibridização *in situ* que células endoteliais produzem TN-C *in vitro* e em GBMs humanos esta glicoproteína deposita-se nos vasos neoformados do tumor. Estes pesquisadores evidenciaram ainda que células de GBMs e astrocitomas anaplásicos

expressam a TN-C como uma fina rede fibrilar envolvendo as células tumorais, sendo essa expressão heterogênea entre as células e localizada na interface do tumor com o tecido normal. Outro fato ressaltado por Kim et al. (2000) é que a expressão de TN-C por GBMs humanos é mais evidente ao redor das células tumorais, mas pode ser encontrada também envolvendo vasos e na rede tumoral (BOUTERFA et al., 1999; ZAGZAG et al., 1996; KIM et al., 2000; HEROLD-MENDE et al., 2002).

Esses resultados em conjunto sugerem um papel da TN-C não apenas na migração tumoral, mas também no evento de neoangiogênese. Além disso, a TN-C pode tanto estimular, quanto inibir a migração em células de glioma. Uma explicação para estes resultados conflitantes é que o papel da TN-C sobre a migração e diferenciação pode estar relacionado também com o tipo celular que a produz, dado que células não tumorais não sintetizam a mesma combinação de isoformas de TN-C que as células tumorais. Como mostrado por Bouterfa et al. (1999), e citado na introdução, a expressão da MEC por tumores também pode ser induzida pelo ambiente exposto às células tumorais. Assim, fatores solúveis como citocinas e fatores de crescimento poderiam induzir a expressão de MEC pelas células tumorais sem a necessidade que estas mantenham contatos diretos com as células normais do cérebro. Terapias anti-tumorais baseadas na expressão diferencial de TN-C por gliomas têm sido desenvolvidas nos últimos anos. Reardon et al. (2002) mostraram que a administração de anticorpos anti-TNC (marcados com I^{131} radioativo) no espaço deixado pelo tumor excerto permitiu uma radioterapia seletiva e localizada, resultando em um aumento da sobrevida dos pacientes com GBM (BOUTERFA et al., 1999; HEROLD-MENDE et al., 2002; REARDON et al., 2002).

O modelo de glioma aqui usado expressou consistentemente a TN-C (**Prancha 11**). A imunomarcação foi heterogênea sendo expressa em apenas uma pequena população de células para a maioria dos tumores. Essas células marcadas positivamente eram dispostas principalmente nas margens dos tumores, isto é, nas áreas infiltrativas. Em geral a presença de células marcadas no centro do tumor e em áreas de necrose era muito menos freqüente, mas pôde ser identificada. Observou-se uma marcação característica, em forma de anéis, envolvendo as células tumorais. Este padrão de marcação sugeriu uma distribuição preponderantemente pericelular da TN-C. Contudo, as análises de tumores imunomarcados para TNC e intensificados com ósmio mostraram que este elemento de matriz também pôde ser encontrado num padrão mais disperso pela MEC tumoral (**Prancha 11**). Essa expressão de TN-C na matriz pericelular pôde ser corroborada também através de imunocitoquímicas em microscopia eletrônica realizadas pelo doutorando Juliano Miyake do Laboratório de

Metabolismo da Célula Tumoral (dados ainda não publicados). Foram encontradas células marcadas positivamente não apenas no estroma tumoral, mas também em vasos adjacentes ao tumor. Este resultado sugere que as células C6 que migram ao longo dos vasos peritumorais também podem expressar essa glicoproteína. Ou ainda que a TN-C seria um indutor à migração perivascular característica desses tumores. Além disso, algumas células marcadas positivamente foram encontradas isoladas, em sítios de tecido normal relativamente distantes do tumor. No hemisfério cerebral contralateral não foram observadas células marcadas associadas a vasos ou no parênquima cerebral. Esse resultado condiz com o que é descrito na literatura quanto a não expressão de TN-C no cérebro adulto. Apesar de alguns trabalhos citarem a expressão de TN-C na região da cicatriz glial, não foi observada a expressão desta molécula neste sítio no modelo aqui estudado.

A natureza da imunomarcação da TN-C aqui observada é corroborada pelas evidências da literatura e poderia sugerir um grau de anaplasia maior para este modelo. De fato, foram observadas diferentes concentrações de marcação dependendo do tumor analisado. Enquanto a maioria dos tumores apresentou uma expressão restrita às áreas infiltrativas, outros apresentaram a expressão de TN-C na maior parte do tumor. Essa diferença de expressão sugere que mesmo em um grupo experimental que foi inoculado com o mesmo estoque de células o padrão de expressão de TN-C pode ser variável e dependente de estímulos do ambiente onde as células estão inseridas.

Além da TN-C foi também analisada a expressão da TN-R nos tumores implantados. Como citado na introdução, a TN-R é uma glicoproteína de expressão exclusiva do SNC e é expressa em cérebros adultos por oligodendrócitos e subpopulações de neurônios corticais. A imunomarcação consistente destes neurônios corticais foi observada nos modelos C6 e usada como controle positivo de marcação (**Prancha 11**). A TN-R foi detectada envolvendo os corpos celulares e dendritos proximais dos neurônios numa localização condizente com a predita rede perineuronal. Embora Carnemolla et al. (1996) tenham identificado RNAm desta proteína em neoplasias cerebrais primárias, nenhum trabalho sobre a expressão protéica de TN-R em gliomas foi encontrado. O modelo aqui estudado não apresentou a expressão de TN-R no tumor como pode ser observado na **prancha 11 e prancha 12 (imagem A)**. No entanto, foi observada uma marcação intensa desta glicoproteína adesiva na região da cicatriz glial que envolve o tumor. Essa marcação foi intensa na grande maioria dos tumores, mas pôde-se observar uma heterogeneidade na sua expressão entre os animais experimentais, com alguns animais apresentando uma imunomarcação bem mais tênue de TN-R. As análises comparadas da expressão de GFAP e TN-R mostram que todos os

animais apresentaram uma indução da cicatriz glial pelos tumores, mas nem todos apresentaram uma intensa expressão de TN-R nesses sítios. Essas observações sugerem que a imunomarcção de TN-R não está condicionada apenas à presença da cicatriz glial e outros fatores podem controlar sua expressão. Acredita-se que a TN-R imunodetectada na cicatriz glial seja de origem oligodendrocítica e, como citado na introdução, poderia ser um fator de estímulo à migração das células tumorais, pois se apresenta como um substrato adesivo para astrócitos. Foi observada também uma marcação uniforme e fraca de TN-R no parênquima do tecido cerebral normal (CARNEMOLLA et al., 1996).

Expressão da TN-R em tumores humanos foi observada em apenas uma lâmina e é mostrada na **prancha 12 (imagem B)**. Sua imunomarcção foi restrita a poucas células nos dois tumores analisados. Essa expressão apresentou um aspecto condizente com a localização pericelular da TN-R. Contudo, não foi possível afirmar a natureza da célula marcada, se tumoral, oligodendrocítica ou astrocítica.

Também foram realizadas imunomarcações de TN-C e TN-R em C6 *in vitro* (**Prancha 13**). Como pode ser visto nas imagens, os padrões de imunomarcção de TN-C e TN-R *in vitro* se invertem quando comparados aos tumores *in vivo*. A TN-R foi muito mais imunomarcada *in vitro* do que a TN-C, no entanto, *in vivo* o tumor não foi capaz de expressar essa TN. De fato, Carnemolla et al. (1996) evidenciaram a expressão do RNAm de TN-R em tumores cerebrais. Além disso, a expressão dessa TN pode ser induzida por diferentes fatores de crescimento como o PDGF. Em cultivo as células C6 foram cultivadas na presença de soro fetal bovino que apresenta PDGF em sua composição. Já a TN-C não foi expressa *in vitro*, ao contrário de *in vivo*. A não expressão da TN-C *in vitro* sugere que a sua expressão possa ser dependente das interações celulares e da indução do microambiente do SNC. De fato essa expressão induzida pelo ambiente é uma característica de diferentes glicoproteínas.

4.3.2 Glicoproteínas adesivas FN e VN

A FN (FN) é uma glicoproteína adesiva (vide introdução), e a sua produção por células de glioma remonta ao final da década de 1970 e início de 1980 quando Mckeever et al. (1986), Halfter et al. (1989), entre outros, evidenciaram que células C6, cultivos primários de gliomas e astrócitos normais eram capazes de produzi-la. Schachner et al. (1978) mostraram a presença de FN na junção gliomesenquimal de tumores, mas não em neurônios, em células da glia normais e em tumores gliais. Já Chintala et al. (1996)

mostraram que a FN, o colágeno IV e a laminina são encontradas tanto na MEC quanto nas células tumorais. A FN apresenta diversas isoformas resultantes do “splicing” alternativo de três diferentes regiões do RNAm (ED-A, ED-B e IIICS). As regiões ED-A e ED-B são excluídas do RNAm maduro, mas Chintala et al. (1996a) mostraram que gliomas malignos (GBMs e Astrocitomas anaplásicos) expressam isoformas de FN que contêm essas duas seqüências (MCKEEVER et al., 1986; HALFTER et al., 1989; SCHACHNER et al., 1978; OHNISHI et al., 1998; OHNISHI et al. 1997; CHINTALA et al., 1996a).

Tanto a laminina quanto a FN são potentes mediadores da adesão e motilidade celulares em diversas células como fibroblastos, células da crista neural e células tumorais.

O modelo C6 aqui estudado mostrou-se hábil em expressar FN como pode ser visto na **prancha 14**. A imunomarcagem da FN foi intensa em todos os tumores observados e apresentou tanto um aspecto fibrilar, envolvendo as células tumorais, quanto um aspecto mais associado à matriz pericelular (indicado pelas setas abertas na **Prancha 14**). Este segundo padrão de marcação foi muito comum em áreas próximas às bordas do tumor, no limite com o tecido normal, que são os sítios de potencial reincidência da doença pós-cirurgia. Um fato interessante evidenciado por Halfter et al. (1989) foi que a detecção imunocitoquímica da FN foi encontrada preponderantemente na superfície das células marcadas e não na matriz extracelular. No modelo C6 essa diferença de padrão de expressão parece estar fortemente relacionada com o sítio onde as células C6 estão localizadas, isto é, nas bordas infiltrativas do tumor (HALFTER et al., 1989).

Os principais receptores de superfície celular para a FN são as integrinas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, e $\alpha_9\beta_1$) que são capazes de ativar cascatas de sinais intracelulares diretamente relacionados com o controle do ciclo celular. As integrinas apresentam um papel essencial na fibrilogênese da FN, pois mediam a interação desta com elementos do citoesqueleto. Esses receptores interferem em, por exemplo, GTPases da família Rho, na FAK, no Src, na paxilina, na vinculina e na α -actinina. Han et al. (2001) mostraram que citocinas produzidas pelo próprio tumor (TGF- β_1) podem cooperar com a integrina $\alpha_5\beta_1$ na regulação da paxilina em astrocitomas malignos aumentando a capacidade de adesão e dispersão destas células em FN. Provavelmente, por estarem em franco processo de migração e invasão, as células das bordas infiltrativas dos tumores C6 apresentem um padrão de expressão pericelular por estarem associadas às suas integrinas ligantes. De fato, a subunidade β_1 das integrinas foi expressa no modelo aqui estudado e mais fortemente nas bordas tumorais, como será mostrado adiante. Por outro lado, Chintala et al. (1996b) evidenciaram que GBMs *in vivo* e *in vitro* apresentam uma expressão variável e heterogênea da integrina $\alpha_5\beta_1$, mas a expressão

deste receptor não está relacionada com a resposta migratória da célula e sim com a sua adesão à FN. Além disso, os tumores que expressaram mais esta integrina, também foram mais hábeis em migrar pela FN. Esses pesquisadores mostraram que linhagens *in vitro* de GBMs podem migrar pela FN tanto de forma quimiotáctil, quanto quimiocinética. Assim, se GBMs expressam fortemente receptores responsáveis pela migração quimiocinética das células por FN, então a infiltração difusa destes tumores no parênquima cerebral seria independente da quantidade de FN depositada na MEC (HALFTER et al., 1989; HAN et al., 2001)

Foi observada também uma moderada imunomarcagem de FN nos vasos tumorais do modelo C6, o que condiz com os dados da literatura. Como mostrado por Chintala et al. (1996a), GBMs expressam isoformas de FN com as regiões ED-A e ED-B. Castellani et al. (2002) mostraram que dessas isoformas aquelas que apresentavam a região ED-B foram expressas pelos vasos tumorais, mas não pelos vasos normais o que sugere um papel na angiogênese tumoral. De fato, os vasos do parênquima normal dos animais aqui estudados apresentaram uma expressão quase nula dessa glicoproteína. Estudos mostram que a FN induz a formação de novos vasos e é a primeira proteína a ser depositada na MEC das células endoteliais tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Uma MEC rica em FN pode induzir a proliferação e migração de células endoteliais, mas não participa da formação dos vasos e de sua maturação. A expressão das isoformas que contêm as seqüências ED-A e ED-B pode estimular a migração de células de glioma muito mais fortemente do que isoformas que não contêm essas seqüências. Assim, a expressão destas isoformas pela vasculatura do tumor poderia ser um fator de “atração” para as células tumorais. No cérebro normal a FN está restrita às membranas basais dos vasos e, por ser um substrato adesivo permissível à migração de células de glioma poderia ser uma das razões da preferência destas em migrar no espaço perivascular. Estudos mostram que as células apresentam a preferência de migrar ao longo de células mesenquimais FN-positivas, o que reforça a observação de que células de glioma utilizariam os vasos como trilhos de migração. No modelo aqui estudado a expressão de FN nas membranas basais do tecido normal pode não ter sido identificada devido à baixa sensibilidade da técnica de imunohistoquímica em detectar-se expressões protéicas muito baixas. Por outro lado, a produção de FN pelas células tumorais teria um papel na remodelação da MEC circundante. Assim como foi observado para tumores humanos por outros pesquisadores, tanto as células tumorais, quanto as células endoteliais dos vasos neoformados foram capazes de expressar a FN (CHINTALA et al., 1996a; CASTELLANI et al., 2002).

Além de uma nítida expressão de FN nas bordas tumorais também foi observada a marcação para essa glicoproteína no centro do tumor e em alguns casos nos centros necróticos tumorais. Um fato interessante observado foi que áreas altamente proliferativas do tumor (como a indicada por um asterisco na **Prancha 14**) não expressaram a FN. Essa não expressão foi observada em todos os tumores observados. As análises da expressão de FN por C6 *in vitro* mostraram que esta glicoproteína é eficientemente depositada entre as células de glioma, num padrão filamentar (detalhe da **Prancha 14**). Contudo, um fato curioso pôde ser observado comparando-se a natureza das células produtoras de FN *in vitro* versus *in vivo*. A marcação com PCNA (um marcador de células em divisão) das células C6 *in vitro* mostrou que a vasta maioria dessas células encontrava-se em algum estágio da divisão celular. Logo *in vitro* células proliferativas expressam e depositam a FN eficientemente. Por outro lado, *in vivo* as áreas proliferativas do tumor não apresentaram essa expressão de FN. Esse dado sugere que as interações entre a matriz do cérebro normal, a matriz modificada/produzida pelo tumor e as moléculas de adesão das células regulam a expressão de FN diferencialmente nas células em proliferação *in vivo* em comparação com as células C6 *in vitro*. Provavelmente as células das bordas do tumor e áreas infiltrativas apresentem *in vivo* um padrão de expressão de elementos de MEC altamente regulado que poderia ser induzido pelo tecido gliótico (astrócitos reativos), pelo tumor *per se*, pela quebra da barreira hematoencefálica, entre outros.

Apesar de todos os animais analisados terem expressado esta glicoproteína em seus tumores, observou-se que alguns animais apresentaram uma expressão mais elevada sugerindo uma heterogeneidade tumoral intra-experimental na expressão da FN. Isso pôde ser observado mesmo em animais do mesmo grupo experimental, o que novamente reforça o forte papel dos estímulos individuais sobre o desenvolvimento do tumor.

Outro fato interessante observado foi a aparente expressão da FN nos núcleos de algumas células C6. Este padrão de expressão foi mais esporádico e é mostrado na **prancha 14**.

A VN (ou VN), outra glicoproteína adesiva, também é expressa por astrocitomas malignos. A VN é a principal glicoproteína presente no plasma e regula cascatas proteolíticas mediadas pela célula, como por exemplo, o sistema fibrinolítico. Aliada a sua habilidade de ligar-se às células via RGD, essa função proteolítica permite a VN mediar dois eventos importantes no metabolismo tumoral, adesão e invasão. Em relação à sua conformação a VN é uma molécula muito dinâmica e pode formar estruturas multiméricas capazes de interagir com inúmeras outras moléculas como, por exemplo, o colágeno e o

receptor de uroquinase. Além disso, essa forma multimérica é requerida nas ligações com as células e com a matriz extracelular (SEINFFERT e LOSKUTOFF, 1996).

O modelo de GBM aqui estudado mostrou-se especialmente apto em expressar essa glicoproteína em todos os 11 tumores analisados. A expressão de VN foi observada preponderantemente nas bordas dos tumores, como está apresentado na **prancha 15**. As foto-montagens mostram claramente essa distribuição da marcação em três diferentes tumores. Um fato interessante observado em todos os animais é que uma ausência de marcação foi encontrada ao redor do tumor em alguns sítios específicos. Acredita-se que essas são as áreas relativas à cicatriz glial induzida pelos tumores. Esse dado pôde ser evidenciado com a imunomarcação de GFAP em cortes subseqüentes àqueles imunomarcados para a VN. De fato, diversos trabalhos mostram que o aumento da expressão de VN está relacionado ou com eventos morfogênicos durante o período embrionário, sendo sua expressão preponderante em astrócitos imaturos e em neoplasias. Astrócitos reativos apresentam um fenótipo altamente diferenciado e, portanto, não expressam VN.

As áreas altamente proliferativas do tumor apresentaram uma marcação de VN muito reduzida (asteriscos) assim como foi observado para a FN. Por outro lado a VN foi expressa em áreas de necrose como citado por Schwartz et al. (1999).

Em vários tumores a imunomarcação para VN apresentou-se nitidamente ao redor e entre as células, o que conota uma deposição dessa glicoproteína na MEC. Assim como foi observado para a FN, houve um nítido padrão de expressão pericelular da VN. Essa expressão pareceu formar intrincadas redes fibrilares ao redor das células C6 (detalhe do tumor 2 – **Prancha 15**). A expressão citoplasmática de VN não pôde ser confirmada já que a maioria das células C6 era pequena, o que tornou a precisa distinção do citoplasma e núcleo das células prejudicada. De fato, a análise dos tumores C6 em microscopia eletrônica evidenciou que essas células apresentam um citoplasma muito delgado e, portanto o tamanho final da célula é praticamente o tamanho de seu núcleo quando analisada em microscopia óptica. No entanto, convém ressaltar que a morfologia da célula é bastante diferente quando em migração em comparação com as células no centro do tumor. A presença de expansões citoplasmáticas nas células migrantes permite em alguns casos a distinção da marcação nuclear e citoplasmática. Porém essa distinção da marcação de VN no núcleo celular versus citoplasma foi dificultada pela técnica de intensificação por ósmio adotada, que tornou as reações intensas e enegrecidas. Por outro lado, esse procedimento

de intensificação da reação permitiu a imunomarcção eficiente de VN nos materiais analisados.

Em muitos tumores a expressão de VN indicou também o sentido de infiltração do tumor. Esse dado é muito interessante e ainda não havia sido descrito na literatura. Convém ressaltar que o sentido da migração/invasão de diferentes tumores analisados pôde ser determinado através da observação cuidadosa dos cortes seriados desses tumores. Enquanto a expressão de VN foi intensa no pólo invasivo do tumor, a sua expressão foi mais reduzida no pólo contrário. Os três tumores apresentados na **prancha 15** ilustram essa observação.

Além de ter sido depositada nas células C6 do centro e das bordas infiltrativas dos tumores, a VN também foi fortemente expressa pelas células C6 migrando por vasos peritumorais. Em praticamente todos os tumores essas células isoladas foram as que mais fortemente expressaram a VN e também puderam ser observadas em sítios mais distantes do tumor. Essa expressão sugere fortemente um papel da VN no padrão de migração associado aos vasos presente nos GBMs. Como citado na introdução, o parênquima cerebral normal é muito pobre em elementos de MEC permissíveis à migração. Assim, as membranas basais dos vasos tornam-se sítios preferenciais de migração por serem especialmente ricas em matriz fibrilar (colágenos) e glicoproteínas adesivas. Ao contrário do que foi observado por Gladson et al. (1995), no cérebro normal dos animais aqui estudados a VN foi expressa nas membranas basais dos vasos, tanto de pequeno calibre, quanto grande calibre (**Prancha 15 e Prancha 17**). Dentre todas as moléculas analisadas no presente trabalho a VN se apresentou como o melhor marcador de vasos. Sua expressão também foi fortemente encontrada na pia-máter. Embora o cérebro humano adulto seja desprovido de VN, sob certas condições como tumores, lesões e necrose ela é expressa novamente (UHM et al., 1999a, SEIFFERT, 1997). Já em roedores a expressão de VN é encontrada em diversos órgãos do animal adulto, inclusive cérebro (SCHVARTZ et al., 1999; SOLEM¹ et al., 1991 APUD GLADSON et al., 1995; EINHEBER² et al., 1996 APUD MILNER et al., 1999). Sua expressão é finamente regulada durante o desenvolvimento do SNC. Seiffert et al. (1995) evidenciaram a expressão de RNAm de VN a partir do décimo dia do embrião de murinos. Durante o desenvolvimento a expressão de VN aumentou e os transcritos foram encontrados principalmente nas meninges do córtex e na proximidade dos capilares. Já pericários dos neurônios, não apresentaram a expressão de transcritos de VN. Em outro estudo, o mesmo autor mostrou que o RNAm de VN é encontrado no cérebro adulto de camundongo (SEIFFERT et al., 1994).

¹SOLEM, M.; HELMRICH, A.; COLLODI, P.; BARNES, D. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 100, n. 2, p. 141-9, 1991.

²EINHEBER, S.; SCHNAPP, L.M.; SALZER, J.L.; CAPPIELLO, Z.B.; MILNER, T.A. *J. Comp. Neurol.*, v. 370, n. 1, p. 105-34, 1996.

Outro fato interessante aqui observado foi a forte imunomarcção da VN em tumores C6 altamente invasivos e capazes de migrar por fibras mielinizadas. De fato, como mostrou Amberger et al. (1998) a linhagem C6 é extremamente hábil em migrar por fibras mielinizadas dada a expressão de MT-MMPs capazes de neutralizar os inibidores de migração (como bNI-220 e NI35/250) presentes na mielina. Nos tumores estudados no presente trabalho a VN parece ter também um papel fundamental na migração/invasão pelas fibras mielinizadas. As **pranchas 16 e 17** apresentam um exemplo de glioma que migrou ativamente pelo corpo caloso dos animais, sendo a prancha 16 o controle negativo da reação observada no tumor da **prancha 17**. Na prancha 15 o tumor 1 foi capaz de cruzar o corpo caloso do animal. Como foi observado para tumores que migravam pela substância cinzenta dos animais, a intensidade da imunomarcção de VN foi muito maior nos pólos infiltrativos do tumor. Isso também foi observado, através da análise do RNAm de VN, por Gladson et al. (1995) para a linhagem de astrocitoma humano U-251 MG implantada em camundongos “nude”. Por outro lado, os autores não observaram a expressão do RNAm de VN no centro do tumor, o que vai de encontro com o que foi observado no modelo C6 (AMBERGER et al., 1998; GLADSON et al., 1995).

A VN pode aderir às células via três diferentes tipos de integrinas ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$) que são expressas em linhagens de gliomas humanos num padrão bem distinto. *In situ* as subunidades α_v e β_5 são expressas no parênquima tumoral e, em contraste, a subunidade β_3 é expressa nas margens do tumor. Uhm et al. (1999) sugerem ainda que a VN poderia ter um papel na resistência a quimioterapias, uma das características dos GBMs. Assim, a VN serviria não apenas como um substrato adesivo para as células de glioma, mas também como um inibidor de apoptose, via a sua ligação com integrinas específicas como a $\alpha_v\beta_3$. A integrina $\alpha_v\beta_3$ tem sido associada ao aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como o BCL-2 e o BCL-X (GLADSON et al., 1995; UHM et al., 1999A; WECHSLER-REYA, 2001).

Aparentemente, todas as células C6 neoplásicas expressaram a VN, contudo, aquelas próximas às bordas infiltrativas do tumor apresentaram uma imunomarcção muito aumentada. Um fato interessante observado foi que tumores que migraram ativamente pelo corpo caloso dos animais também apresentaram um número maior de células que expressavam o pigmento citado no tópico 1 da presente discussão. A observação cuidadosa dos controles negativos das reações mostrou que as células que expressaram pigmento também expressaram VN fortemente. Assim a presença desse pigmento poderia estar associada à capacidade invasiva das células C6 (**vide Pranchas 16 e 17**).

Os vasos normais próximos ao tumor também apresentaram uma forte expressão de VN, como pode ser observado na **prancha 17 (detalhe C)**. O tumor 1 da **prancha 15** mostra um corte na altura em que o tumor cruzou o corpo caloso do animal. Pode-se observar nitidamente células com imunomarcção pericelular de VN o que conota um papel desse elemento de MEC também na invasão ativa através de fibras mielinizadas. Gladson e Cheresh (1991) mostraram que a expressão de VN está associada com gliomas mais malignos e a sua expressão em astrocitomas de baixo grau não pôde ser encontrada. Por outro lado, os autores não observaram a expressão de transcritos de VN em nenhuma célula do tecido normal dos animais (GLADSON et al., 1995). Aliados os dados sugerem fortemente que a linhagem C6 *in vivo* é capaz de induzir a formação de gliomas com alto grau de anaplasia, confirmando o seu papel como um eficiente modelo de GBM (GLADSON e CHERESH, 1991; GLADSON et al., 1995).

Algumas análises da expressão de VN *in vitro* também foram realizadas. As células C6 apresentaram uma expressão muito fraca de VN no citoplasma e nenhuma evidência da deposição desta no espaço extracelular. Como observado por Gladson et al. (1995) células de astrocitoma U-251MG não são capazes de expressar o gene da VN quando injetadas subcutaneamente em camundongos, o que sugere que o microambiente tecidual local tem um papel indispensável na expressão gênica desta glicoproteína em gliomas. A VN é produzida pelo fígado e está presente no soro, assim a sua expressão por células não hepáticas é dependente da indução em condições fisiológicas muito específicas. No SNC esta glicoproteína é muito expressa durante o desenvolvimento e tem um papel na diferenciação de neurônios motores da medula espinhal e de neurônios cerebelares (GLADSON et al., 1995).

A **prancha 18** mostra as imunomarcações para VN e FN em um dos GBMs humanos analisados. A VN foi fortemente expressa num padrão muito similar àquele encontrado nos gliomas de rato C6. A sua expressão pôde ser observada tanto no citoplasma das células (**imagem B da prancha 18**) quanto na predita MEC (**imagens C, D e E da Prancha 18**). Além disso, observou-se uma expressão de VN muito mais forte em algumas regiões do tumor. Convém ressaltar que as análises de cortes de tumores humanos não permitem a caracterização do tumor como um todo, pois durante a cirurgia o tumor é extraído em pequenos fragmentos. Um dado interessante, e apresentado na **imagem F da prancha 18**, mostra a expressão intensa de VN no centro necrótico do tumor. Esse resultado condiz com o que é descrito na literatura quanto a re-expressão de VN em lesões e necrose (SCHVARTZ et al., 1999).

A FN também foi fortemente expressa nos GBMs humanos analisados. Apesar da imunomarcção de FN não ter sido tão intensa quanto a de VN, a sua distribuição foi mais uniforme pelos fragmentos de tumor. A FN apresentou um aspecto fibrilar o que sugere a sua deposição na MEC tumoral. Seu padrão de expressão se assemelhou àquele observado para os tumores C6. A expressão de FN não foi observada nas áreas de necrose dos dois GBMs humanos analisados.

4.3.3 Colágenos I, III e IV

Os outros elementos de MEC estudados no presente trabalho foram os colágenos I, III e IV. No SNC os colágenos (I, III e IV) podem ser encontrados na limitante externa da glia, mas suas expressões são preponderantes nas membranas basais dos vasos. As **pranchas 19 e 20** mostram as imunomarcções comparadas entre os três tipos de colágenos em quatro diferentes tumores. Todos os animais analisados foram capazes de expressar esses colágenos nos tumores. A natureza das células que os depositaram não pôde ser esclarecida, mas dado que as imunomarcções foram encontradas no tumor como um todo, acredita-se que as células de gliomas foram as principais responsáveis pela expressão desses colágenos. No caso do colágeno tipo IV, os endoteliócitos dos vasos tumorais provavelmente também tiveram um papel nesta produção.

O colágeno tipo I foi o que apresentou a imunomarcção mais intensa entre os colágenos analisados, acrescido a isso foi possível encontrar diversas células isoladas fortemente marcadas para colágeno tipo I nos tumores analisados (**Prancha 20 - imagem F, Prancha 21 – Imagem B**). Essas células com marcação mais intensa se concentraram nas áreas mais infiltrativas da neoplasia. Em alguns gliomas também foi possível encontrar células fortemente marcadas e distantes do tumor principal, o que conota que a expressão de colágeno tipo I *in vivo* tem um papel chave na capacidade altamente invasiva de células de glioma. Muitas vezes essas células apresentaram-se associadas a vasos peritumorais. A presença de células intensamente marcadas também coincidiu com células de glioma que expressavam pigmento. Uma imagem dessas células pode ser vista na **prancha 20**, imagem F. O padrão de marcação do colágeno I foi muito peculiar em relação aos outros colágenos. Em maior aumento (**Prancha 21**) a imunomarcção do colágeno I formou uma fina rede que envolvia as células tumorais e que apresentava um aspecto heterogêneo com áreas de marcação puntiformes. Aparentemente o colágeno I pode ter sido depositado nas

proximidades das superfícies das células formando uma MEC pericelular. Esse colágeno foi fracamente expresso em sítios proliferativos e na cicatriz glial dos tumores analisados. No tecido normal dos ratos analisados o colágeno tipo I foi moderadamente expresso nas membranas basais dos vasos.

Diversos trabalhos mostram que C6 é eficiente em migrar por colágeno tipo I. *In vitro* Goldberg et al. (1992) mostraram que C6 apresenta uma alta habilidade de migrar e invadir preparados tridimensionais puros de colágeno tipo I via secreção de enzimas proteolíticas como uPA e metaloproteases. Os autores observaram ainda que as células apresentaram uma migração muito maior em substratos de colágeno tipo I do que substratos ricos em colágeno tipo IV. Em GBMs humanos Vitolo et al. (1996) mostraram que a expressão de colágeno tipo I e FN foi irregularmente distribuída e envolveu tanto as células neoplásicas quanto as células da microglia. Os autores observaram ainda que todas as membranas basais associadas às áreas de proliferação endotelial foram colágeno tipo I, FN e laminina positivas. Outros trabalhos mostram a expressão de colágeno tipo I por células de glioma *in vitro*. Bouterfa et al. (1999) mostraram a expressão de transcritos de colágeno tipo I em quatro linhagens de glioblastoma (GaMG, U373MG, U138MG e U251MG) *in vitro* (GOLDBERG et al., 1992; VITOLO et al., 1996; BOUTERFA et al., 1999).

Já os colágenos tipo III e IV apresentaram uma imunomarcacão mais homogênea que o colágeno tipo I nos gliomas C6 *in vivo*. As **pranchas 19 e 20** mostram imunomarcacões em 4 diferentes animais. Observe que para os colágenos tipo III e IV não existe a presença de células isoladas fortemente marcadas como foi observado nas imunomarcacões para o colágeno tipo I. O colágeno tipo III apresentou expressão apenas no tumor e não no tecido normal.

A expressão do colágeno tipo IV no tecido normal foi encontrada associada aos vasos, principalmente de grande e médio calibres, e na pia máter. Ao contrário do que era esperado, o colágeno tipo IV não foi um bom marcador de vasos no modelo estudado, pois sua marcação em vasos de menor calibre foi mais fraca comparativamente com a VN, que por sua vez, marcou muito mais intensamente os vasos dos tecidos normais e peritumorais dos animais. A **prancha 22** mostra vasos presentes no tecido normal e marcados para colágeno tipo IV.

Dentre os três colágenos analisados, apenas o colágeno tipo I foi expresso pelos GBMs humanos analisados. As imunomarcacões podem ser vistas na prancha 23. Em ambos tumores analisados a marcação de colágeno foi esparsa nos fragmentos tumorais. O

colágeno foi encontrado na MEC tanto num padrão fibrilar (como pode ser observado na **imagem D da Prancha 23**), quanto puntiforme (**imagem C, Prancha 23**). Esses padrões de expressão foram muito similares àqueles observados para o modelo C6. A marcação do colágeno I também pôde ser observada pericelularmente nos GBMs humanos, formando um fino halo ao redor das células. Já a expressão de colágeno tipo I nas membranas basais dos vasos foi muito rara em ambos os GBMs analisados.

As análises das expressões dos colágenos I, III e IV *in vitro* (prancha 24) evidenciaram que C6 não foi capaz de depositar significativamente nenhum desses colágenos. De fato, Mckeever et al. (1986) observaram a expressão de colágeno I por sete linhagens de gliomas diversos, exceto pela linhagem C6, que não foi capaz de expressar esse elemento de MEC *in vitro*. Por outro lado, os autores observaram a expressão de colágeno tipo IV pelas células C6 na presença de ascorbato de sódio (MCKEEVER et al., 1986).

4.3.4 Proteoglicanas : Brevican, Versican e Agrecan

Além das glicoproteínas adesivas e colágenos, os proteoglicanos seriam outros elementos de MEC que poderiam influenciar no potencial migratório de C6 *in vivo*. Como explicitado na introdução desse relatório, diversos trabalhos relacionam os proteoglicanos, em especial o versican e o brevican, com o comportamento agressivo de tumores cerebrais. Nesse contexto, as expressões de versican, brevican e agrecan foram analisadas nos tumores C6 e estão apresentadas na **prancha 25**. Como pode ser visto nas imagens, o tumor C6 apresentou a expressão dos três proteoglicanos estudados. As marcações foram fracas, (apenas o versican apresentou uma marcação mais intensa) e só puderam ser visualizadas após a digestão enzimática dos cortes com tripsina e a intensificação da reação de DAB com ósmio. No cérebro normal, os astrócitos e oligodendrócitos são os maiores produtores de versican e em tumores a isoforma mais presente é a isoforma V2. Dada a presença de cadeias de glicosaminoglicanas ligadas ao seu eixo protéico, as proteoglicanas apresentam a habilidade de reter moléculas de água e hidratar o meio extracelular tornando-o indutor à migração. A clivagem proteolítica do versican pode gerar produtos capazes de ligarem-se ao HA, como a GHAP, cujo papel ainda é foco de estudos.

Dentre as três proteoglicanas estudadas, o versican foi a que apresentou a marcação mais característica. A sua expressão foi observada tanto associada à superfície das células tumorais que permeiam as regiões necróticas do tumor, quanto no espaço condizente com a

matriz extracelular do tumor (**Prancha 25 – Imagem A**). A expressão de versican em áreas de necrose de GBMs já foi citada anteriormente na literatura e poderia explicar, em parte, a intensa expressão dessa proteoglicana nos tumores analisados. Essa expressão em áreas perinecroticas sugere a ação de citocinas e fatores necróticos em sua produção. Nem todos os tumores observados apresentaram áreas de necrose detectáveis em microscopia óptica, mas o versican foi consistentemente expresso em todos os animais experimentais. No centro proliferativo dos tumores observados não foi imunodetectada a expressão de versican, o que sugere que as células em franca divisão não apresentam um papel na deposição dessa proteoglicana (**Prancha 25 – Imagem A**). O anticorpo aqui usado apresenta afinidade tanto pelo versican maduro, quanto imaturo. Por esse motivo foi possível se observar a expressão de versican também no citoplasma de algumas poucas células de glioma C6 que apresentaram expansões citoplasmáticas (as células sem essas expansões não permitiram a visualização de seus citoplasmas em microscopia de luz em virtude de seus tamanhos diminutos). Observou-se ainda uma expressão aumentada do versican em células associadas a vasos peritumorais, tanto em sítios muito próximos ao tumor, como em vasos peritumorais do tecido normal. As análises morfológicas dessas células sugerem fortemente serem células C6 migrando pelos vasos. Convém ressaltar que no hemisfério contralateral dos animais não foi observada a expressão de versican em células associadas aos vasos e na MEC pericelular de neurônios corticais. Também não foi possível a observação dessa proteoglicana na cicatriz glial induzida pelo tumor.

Vários trabalhos citam a expressão de versican nas redes perineuronais de alguns núcleos cerebrais (YAMAGUCHI, 2000) e por muitos anos a presença de elementos de matriz permeando o espaço entre neurônios (formando finas redes perineuronais) foi severamente criticada por diversos pesquisadores dada a dificuldade metodológica em sua observação. A marcação pericelular nos neurônios normais não foi identificada nas reações aqui realizadas e pode ser decorrente do fato de estar abaixo dos níveis de detecção da metodologia aqui utilizada, ou por um encriptamento dos epítomos reconhecidos pelo anticorpo primário utilizado. Os proteoglicanos oferecem uma dificuldade maior no reconhecimento de seus epítomos pelos anticorpos porque os sítios de ligação desses encontram-se no eixo protéico da molécula, que muitas vezes está “escondido” pelas glicosaminoglicanas ligadas a ele. A digestão enzimática é uma premissa para o reconhecimento desses epítomos pelos anticorpos.

Baseado na literatura procurou-se fazer a digestão enzimática com tripsina em diferentes concentrações. Contudo, os cortes em congelação dos tumores não suportaram

os tratamentos enzimáticos e desprenderam-se das lâminas gelatinizadas com muita facilidade. Infelizmente a técnica de imunohistoquímica por “free-floating” também não pôde ser realizada dada a natureza frágil dos tumores, que se desprendem muito facilmente do tecido circundante. A concentração da tripsina usada na digestão (sugerida=0,01%, padronizada=0,0015%), assim como a temperatura de incubação da mesma (sugerida=37°C, padronizada=25°C), foram muito aquém do sugerido na literatura. Outras técnicas de exposição dos epítomos (como, por exemplo, a exposição dos cortes à microondas) não foram eficientes e levaram ao desprendimento dos cortes das lâminas. Acredita-se que devido a uma exposição de epítomos pouco eficiente, as reações imunohistoquímicas das proteoglicanas foram fracas em sítios de tecido normal e na cicatriz glial onde são descritas como expressas. O versican também é citado como tendo a sua expressão regulada positivamente durante alguns estágios da formação da cicatriz glial, no entanto, esse padrão de expressão não pôde ser averiguado.

Dois dos motivos para os anticorpos não terem conseguido acessar os epítomos dos proteoglicanos na cicatriz glial poderiam ser: (1) a organização intrincada da rede de MEC que se forma nesta situação e (2) a expressão efêmera das moléculas no processo de cicatrização. O tumor, ao contrário, apresenta uma MEC muito mais desorganizada, desagregada e em constante remodelação pela ação de enzimas proteolíticas produzidas pelo próprio tumor. Talvez por esses motivos as células tumorais foram eficientemente imunomarcadas pelos anticorpos anti-versican, anti-brevican e anti-agrecan e o tecido normal não.

Na **prancha 25 (Imagem A)** os tumores 2 e 3 puderam ter suas direções de migração/invasão identificadas pela análise dos cortes seriados. Observou-se uma expressão de versican mais generalizada, principalmente nas suas bordas infiltrativas. A análise desse padrão de expressão na borda infiltrativa do tumor evidenciou ainda uma expressão do versican associado ou próximo à superfície das células C6 (detalhe – setas abertas) formando uma MEC pericelular. O interessante é que esta mesma natureza de marcação não foi observada no centro do tumor onde a expressão do versican foi mais restrita ao espaço extracelular que permeava as células tumorais

Além do versican outras duas proteoglicanas foram identificadas no modelo de GBM de rato C6 (**Prancha 25 – imagem B**). A imunomarcação comparada de brevican e agrecan em diversos animais mostrou que ambas proteoglicanas foram uniformemente expressas pelos tumores analisados e distribuíram-se principalmente na matriz extracelular. Ao contrário do que foi observado para o versican, nenhuma dessas moléculas apresentou-se

mais ou menos expressas nas superfícies das células C6 nos diferentes setores tumorais. As imunomarcações para brevican e agrecan também não foram observadas nas áreas proliferativas dos tumores, assim como na cicatriz glial e tecido normal. Contudo, diferentes trabalhos (vide introdução) mostram a expressão acentuada de proteoglicanos, como o brevican e o versican, em sítios de cicatriz glial. No caso do brevican, a forma secretada é a preponderantemente encontrada em sítios de cicatriz glial, mas sua expressão é acentuada em um período restrito da formação desta cicatriz, período este que condiz com a migração das células gliais.

As expressões para versican, brevican e agrecan em C6 *in vitro* não foram detectadas (**Prancha 26**); esse resultado sugere a necessidade do “ambiente cerebral” para a indução da expressão dessas proteoglicanas.

4.4 Imunodeteção de diferentes moléculas de adesão

4.4.1 Ligantes de ácido hialurônico: RHAMM e CD44

Como citado na introdução, o ácido hialurônico (HA) apresenta uma expressão muito elevada no tecido cerebral e é um substrato muito permissível à migração de células gliais e neoplásicas. Diferentes trabalhos mostram que o HA apresenta um papel importante na invasão e metástase tumorais. Diversas linhagens neoplásicas são capazes de expressar não apenas o ácido hialurônico, mas também seus receptores específicos de superfície celular como o CD44 e o RHAMM.

O RHAMM é capaz de mediar a migração HA-dependente em diversos tipos celulares, incluindo células neuronais. O mecanismo de atuação deste receptor é através de uma cascata de transdução de sinais que leva à fosforilação de tirosinas quinases como, por exemplo, a FAK. Como foi citado na introdução, o RHAMM pode levar a ativação de quinases como ERK, numa via mitógeno-dependente, e assim influenciar na expressão de proteínas envolvidas com a tumorigênese, proliferação e motilidade. A expressão de RHAMM cérebro normal foi observada por Nagy et al. (1995) que mostraram que neurônios são capazes de expressar RHAMM ao longo do comprimento dos neuritos e a migração destes pode ser inibida por anticorpos anti-RHAMM. Em outro estudo, Turley et al. (1994) mostraram a expressão de RHAMM em cultivos primários de astrócitos de ratos recém-nascidos e em duas linhagens de astrócitos imortalizados. A imunomarcação de RHAMM nos processos celulares e a habilidade dos anticorpos anti-RHAMM em reduzir a motilidade

celular sugerem um papel importante desta proteína na migração de astrócitos (NAGY et al., 1995; TURLEY et al., 1994; TURLEY et al., 1993).

Apesar de ter sido identificada a sua expressão em neoplasias de células B, pulmão e pancreáticas, e de apresentar um papel crucial na natureza metastática de certos tipos celulares (como fibroblastos), o papel de RHAMM em neoplasias primárias cerebrais ainda é muito discutido. Por este motivo analisou-se a expressão deste receptor de HA no presente trabalho.

O modelo C6 aqui estudado expressou altos níveis de RHAMM, como pode ser observado na **prancha 27**. A expressão deste receptor de HA foi uniformemente encontrada no tumor, mesmo nas células dos focos necróticos. Mas também foi possível observar-se células muito mais fortemente marcadas nas margens do tumor, na região astrogliótica e mesmo infiltradas no tecido cerebral normal. Esta expressão também foi encontrada na superfície das células e no plano de adesão dos astrócitos ao substrato, o que indicaria um papel deste receptor no reconhecimento e adesão à MEC.

A alta expressão de RHAMM por estas células isoladas sugere serem células tumorais em franca invasão/migração (**Prancha 27**). Suas localizações em sítios mais distantes do tumor sugerem uma capacidade invasiva aumentada nas células imunomarcadas para este receptor nos sítios infiltrativos. Convém ressaltar que essas células isoladas e infiltradas no tecido normal circundante são sabidamente as maiores responsáveis pela reincidência da doença pós-cirúrgica.

Um padrão freqüentemente observado nos tumores analisados foi a expressão intensa de RHAMM em células associadas a vasos peritumorais (**Prancha 27 - detalhe**). Este dado sugere que as células malignas utilizam os vasos como pontos de ancoragem e o RHAMM poderia ter um papel importante nesta migração associada a vasos. Em vasos do hemisfério contralateral (hemisfério cerebral que não recebeu a injeção de células C6) não se observou a expressão de RHAMM em células associadas a vasos, o que indica que aquelas observadas nos vasos peritumorais poderiam ser células C6 infiltrativas.

De fato, Akiyama et al. (2001) mostraram que células de linhagens de gliomas (U87MG, U251, U343, U373, SF539 e SF188) são capazes de expressar RHAMM e o gradiente de expressão de RHAMM foi maior nas linhagens mais malignas. O uso de peptídeos diretamente contra o domínio de ligação HA-RHAMM inibiu totalmente a migração destas linhagens tanto em substratos contendo HA quanto em substratos desprovidos desta GAG. Além disso, foi observado que estas linhagens expressaram tanto a proteína de 85 kDa de RHAMM, quanto a proteína de 73 kDa. As expressões destas duas diferentes

isoformas de RHAMM também foram associadas ao grau de confluência das linhagens, dado que conforme se aumentou o grau de confluência, menor era a expressão de RHAMM 85 kDa e maior a de RHAMM 73 kDa (AKIYAMA et al., 2001).

No modelo aqui estudado a alta expressão de RHAMM na interface do tumor versus tecido normal também pode ser explicada, em parte, pela presença de astrócitos reativos da cicatriz glial. Como observado por Akiyama et al. (2001) a expressão de RHAMM pode ser observada na região astrogliótica. Por outro lado, células astrocitárias normais (não-glióticas) parecem não ser capazes de expressar esse receptor de ácido hialurônico em cérebros adultos (AKIYAMA et al., 2001).

Além do RHAMM, outro receptor de HA, o CD44, teve a sua distribuição espacial estudada no presente trabalho. Em cortes histológicos de gliomas humanos, Ranuncolo et al. (2002) evidenciaram uma forte relação entre a expressão de CD44s (as variantes desta glicoproteína não foram expressas nos tumores analisados) e o grau de anaplasia. Ariza et al. (1995) mostraram por imunohistoquímica em 10 GBMs humanos que todos os espécimes expressavam CD44s na superfície das células tumorais (entre 20% e 80% das células), enquanto os vasos não apresentavam marcação. Por outro lado, a imunomarcação das isoformas variantes de CD44 (CD44v3 e CD44v6) não foi observada nestes materiais, fato corroborado via RT-PCR por Li et al. (1993) em 18 linhagens de glioma *in vitro* (RANUNCOLO et al., 2002; ARIZA et al., 1995; LI et al., 1993A).

No modelo C6 a imunomarcação de CD44 foi fraca em comparação com a imunomarcação do outro receptor de HA, o RHAMM (**Prancha 27**). O anticorpo aqui utilizado reconhece um epítipo comum às diferentes variantes da molécula. O CD44 apresentou uma imunomarcação uniforme e baixa no tumor, e poucas células mais intensamente marcadas foram encontradas no centro ou bordas tumorais. No entanto, foi observada uma marcação mais forte de CD44 nas margens do tumor, na área correspondente à cicatriz glial, porém a natureza desta marcação não foi elucidada. Dada a baixa imunomarcação de CD44 observada em todos os animais usados, buscou-se analisar as reações do anticorpo com alguns controles positivos, descritos na literatura, para o CD44. Foram realizadas imunohistoquímicas em criocortes de baço, linfonodo, tecido cartilaginoso (esterno e orelha) e pele de ratos (**Prancha 28**). Com as mesmas concentrações de anticorpos utilizadas nos criocortes do modelo C6 foi observada, em todos os tecidos testados, uma consistente imunomarcação para CD44. Este resultado evidencia que não é a sensibilidade do anticorpo no reconhecimento do epítipo a razão da baixa imunomarcação de CD44 no tumor C6 e sim a sua provável baixa expressão nesse modelo tumoral.

Um fato interessante observado por Knüpfer et al. (1999) foi que diversas linhagens de GBMs humanas *in vitro* (T98G, A172, 86HG39, 85HG66), juntamente com a linhagem de glioma de rato C6, foram capazes de expressar consistentemente o CD44, contudo, a linhagem C6 apresentou uma taxa de adesão à HA/BSA não significativamente diferente da adesão em BSA somente. Os dados dos autores sugeriram que as células C6 falham em ligar-se especificamente ao HA, mesmo expressando altos níveis de CD44. No entanto, Knüpfer et al. observaram que a capacidade de ligação da linhagem C6 ao HA foi aumentada após tratamentos com hialuronidases. Muitos gliomas são capazes de produzir HA *in vitro* e estocar esta GAG na superfície celular formando os conhecidos “halos pericelulares” que poderiam mascarar a ligação do HA da MEC com as células. Interessantemente Akiyama et al. (2001) mostraram que o tratamento com anticorpos anti-CD44 em cultivos de gliomas malignos não levou a uma redução da capacidade migratória das células (AKIYAMA et al., 2001; KNÜPFER et al., 1999).

Por outro lado, Merzak et al. (1994) e Radotra e McCormick (1997) evidenciaram que a invasão de células de glioma crescidas em Matrigel® foi diminuída em diferentes graus após o tratamento com anticorpo anti-CD44. Além disso, o tratamento destas células com anticorpos anti-CD44 reduziu a adesão celular à FN, laminina, VN e colágeno tipo I (MERZAK et al., 1994; RADOTRA e MCCORMICK, 1997). Lembre-se aqui que o Matrigel é uma matriz extracelular artificial, basicamente composta de elementos presentes na membrana basal que, como mostrado na introdução, não são abundantemente encontrados no cérebro adulto.

A expressão consistente de CD44 observada por Knüpfer et al. (1999) na linhagem C6 e a não identificação dessa forte expressão no nosso modelo pode ser reflexo da regulação negativa do CD44 em uma situação *in vivo*. De fato, o CD44 pode ter a sua expressão modulada pela disponibilidade de MEC circundante. Como sugerido por Knüpfer et al. (1999) pode existir uma organização de MEC pericelular nas células tumorais o que restringiria a ligação dessas com a MEC circundante. Além disso, como observado pelos pesquisadores não houve uma taxa aumentada de adesão dessas células *in vitro* em HA. Esses resultados, unidos aos aqui observados sugerem fortemente que o RHAMM, e não o CD44 apresenta um papel importante no reconhecimento do ácido hialurônico circundante e até mesmo no processo invasivo dos tumores C6 *in vivo*. Como observado por Turley et al. (1993), em células ras-transformadas capazes de expressar tanto RHAMM quanto CD44, o RHAMM (e não o CD44) apresenta um papel crucial na migração celular (KNÜPFER et al., 1999; TURLEY et al., 1993).

As análises das imunomarcações dessas duas moléculas de adesão *in vitro* mostraram um padrão similar ao que foi observado *in vivo* (detalhes da **Prancha 27**), isto é, uma forte imunomarkação de RHAMM pelas células C6 e uma imunomarkação bem menos intensa para o CD44. Um fato interessante observado nas imunohistoquímicas de RHAMM *in vitro*, foi associação da forma intracelular dessa molécula com o fuso mitótico das células C6 em divisão. Diferentes trabalhos identificaram a expressão de RHAMM no fuso mitótico. Assmann et al. (1999) foram os primeiros a reportarem a presença de RHAMM associado aos microtúbulos e sugeriram que sua função seria similar à dos MAPs, uma família de proteínas capazes de se associarem aos microtúbulos. Os autores mostraram que o RHAMM liga-se aos microtúbulos pelo seu N-terminal e também pode associar-se a microfilamentos de actina. Interessantemente, esses pesquisadores descartaram o papel do RHAMM como um receptor de superfície para o ácido hialurônico em células HeLa. Já Maxwell et al. (2003) evidenciaram um papel central do RHAMM na estabilidade do fuso mitótico dado que a perturbação da expressão de RHAMM em células HeLa inibiu a progressão do fuso mitótico e afetou a arquitetura dos microtúbulos. O trabalho mostrou ainda que o RHAMM pode ligar-se de forma cruzada tanto aos microtúbulos, quanto à dineína (ASSMANN et al., 1999; MAXWELL et al., 2003).

Savani et al. (2001) mostraram que tanto o CD44, quanto o RHAMM apresentam um papel chave nas funções endoteliais. Os pesquisadores investigaram a expressão endotelial dessas duas moléculas e determinaram os efeitos de suas inibições com anticorpos anti-CD44 e anti-RHAMM nas funções endoteliais *in vitro* e também na angiogênese *in vivo*. Ambos os receptores foram detectados no endotélio vascular *in situ* e na superfície das células cultivadas. A inibição do CD44 com anticorpos, mas a não inibição do RHAMM, bloqueou a adesão das células em ácido hialurônico e a proliferação endotelial. Já a inibição do RHAMM, mas não a do CD44, inibiu a migração das células em Matrigel®. Ambos os anticorpos inibiram a formação do tubo endotelial *in vitro*, mas apenas a inibição de RHAMM bloqueou a neoangiogênese FGF induzida *in vivo*. Esses dados sugeriram fortemente que ambos, CD44 e RHAMM, são importantes nos eventos angiogênicos (SAVANI et al., 2001).

Ambos os ligantes de HA aqui estudados não foram imunolocalizados em endoteliócitos de vasos associados aos GBM's C6 (a morfologia dos endoteliócitos é bem característica e pode ser diferenciada da morfologia das células C6 migrantes). Contudo a expressão intensa do RHAMM nas bordas dos tumores (que correspondem a um sítio de neoangiogênese intensa) poderia ser um indicativo do papel deste receptor na formação de vasos peritumorais. A expressão já citada de RHAMM em células provavelmente tumorais

associadas a vasos pode estar relacionada também com a característica angiogênica desses tumores. Nesse ponto convém ressaltar que a região onde se encontra uma maior angiogênese nesses tumores corresponde também à cicatriz glial induzida pelo tumor, sítio de intensa remodelação da MEC circundante.

Mohapatra et al. (1996) mostraram em células transformadas que o RHAMM apresenta um papel no controle do ciclo celular. O tratamento com RHAMM solúvel foi capaz de induzir a entrada em divisão em células transformadas através da supressão do complexo Cdc2/ciclina B1. Um fato observado nas imunohistoquímicas de C6 *in vivo* foi a forte expressão de RHAMM nos sítios proliferativos do tumor (o que para a maioria das moléculas analisadas no presente trabalho não foi comum). O papel do RHAMM na formação do fuso mitótico e sua provável ação sobre a regulação de ciclinas envolvidas com a proliferação, associado a seus papéis na migração e invasão celulares, tornam esse receptor num excelente alvo para terapias anti-gliomas (MOHAPATRA et al., 1996).

Imunohistoquímicas para CD44 também foram feitas em GBM's humanos como pode ser visto na **prancha 29**. A expressão de CD44 nos dois tumores humanos testados foi muito forte e apresentou um padrão similar àquele citado na literatura. A expressão de CD44 foi pericelular, formando halos ao redor das células tumorais, o que conota a sua localização na superfície celular desses tumores. Em tumores humanos o CD44 parece apresentar um papel muito mais importante no metabolismo tumoral do que exerce no GBM de rato aqui estudado.

4.4.2 Subunidades das Integrinas: α_v e β_1

As análises das expressões da subunidade β_1 foram realizadas em diversos animais experimentais e mostram que o modelo C6 de glioma é capaz de expressar essa subunidade de integrina. Como citado na introdução, a subunidade β_1 pode ligar-se a diferentes subunidades α e apresenta uma grande gama de ligantes. Os heterodímeros da subfamília β_1 das integrinas ligam-se a elementos de MEC como colágenos (α_1 , α_2), lamininas (α_1 , α_2 , α_3 , α_6 , α_7 , α_9), FN (α_3 , α_4 , α_5 , α_8 , α_v) e VN (α_v). A **prancha 30** mostra as imunohistoquímicas para a subunidade β_1 em quatro diferentes tumores C6. Como pode-se observar, a marcação dessa subunidade de integrina foi homogênea pelo tumor. Além disso, tumores mais infiltrativos, como o tumor 2, apresentaram uma marcação para a subunidade

β_1 mais intensa, o que conota a sua correlação com a agressividade da neoplasia. Esse dado corrobora o trabalho de Paulus et al. (1996), onde foi observado que gliomas com a redução da expressão de β_1 perderam a habilidade invasiva nas bordas do tumor. A subunidade β_1 foi fracamente expressa em sítios proliferativos do tumor assim como na cicatriz glial dos mesmos. O tumor 4 (**Prancha 30**) mostra o detalhe de um tumor que foi altamente invasivo, muitas de suas células apresentaram-se pigmentadas e a expressão da subunidade β_1 das integrinas foi particularmente intensa neste animal. A **prancha 31** mostra o padrão de marcação da subunidade β_1 , observe a sua expressão mais intensa ao redor das células e localizada na superfície das mesmas. Além disso, a expressão de β_1 foi observada em diversas estruturas no cérebro dos animais e que funcionam como um controle positivo interno aos experimentos. A **prancha 32** mostra que a pia-máter, os vasos e o plexo coróide expressaram essa integrina. Essas observações corroboram os resultados de Grooms et al. (1993) que foram apresentados na introdução (PAULUS et al., 1996; GROOMS et al., 1993).

Outra integrina analisada no presente trabalho foi a subunidade α_v . Como pode ser observado nas **pranchas 33 e 34**, essa subunidade de integrina foi fortemente expressa pelo tumor. Observe ainda que a subunidade da integrina α_v foi expressa pelo que parecem ser células tumorais infiltrando o parênquima cerebral. Essas células isoladas apresentaram uma marcação muito mais intensa e encontraram-se especialmente associadas com os vasos, evidenciando uma preferência em migrar através das membranas basais dos vasos associados ao tumor. Esse padrão de marcação em C6 nunca tinha sido observado antes e evidencia o papel tanto da FN e da VN, quanto do seu ligante, a subunidade α_v das integrinas, na capacidade migratória de C6 *in vivo*. Por outro lado, as áreas proliferativas dos tumores analisados apresentaram uma expressão muito baixa da subunidade α_v das integrinas. A análise da imunomarcação dessa integrina no modelo C6 é assim um bom indicador das células C6 migrando por vasos. Além de ter sido expressa por células migrando ao longo dos vasos, a subunidade α_v das integrinas foi expressa em células migrando ao longo de fibras mielinizadas, como o corpo caloso. Vários trabalhos mostram esta preferência das células de GBM em migrarem por fibras mielinizadas o que é um dos grandes motivos da disseminação do GBM para ambos os hemisférios cerebrais formando tumores multicêntricos. Convém ressaltar que nos hemisférios contra-laterais dos animais não foram observadas células similarmente marcadas, tanto associadas a vasos, quanto associadas a fibras mielinizadas

A intensa marcação de integrina α_v em células associadas a vasos e em sítios muito distantes do tumor reforça a idéia de que os maiores responsáveis pela reincidência pós-cirúrgica dos GBMs são as células tumorais migrantes infiltradas no tecido normal e não as células em franca proliferação (que são os principais alvos das quimioterapias convencionais).

A subunidade α_v pode ligar-se às subunidades β_1 , β_3 , β_5 , β_6 e mediar a ligação com FN, VN e TN. Quando ligada à subunidade β_8 a α_v pode ainda reconhecer colágenos e lamininas. A natureza da integrina expressa pelo tumor não pôde ser elucidada, mas dado que a subunidade β_1 não apresentou o mesmo padrão de marcação sugere-se que ela não estava associada à α_v para mediar a adesão e migração por FN e VN. Essa comparação entre as imunomarcações de α_v e β_1 está bem clara na **prancha 34**. Como citado na introdução do presente relatório, a expressão da α_v está relacionada com um maior grau de agressividade do tumor e sua imunomarkação dá-se tanto nos sítios infiltrativos, quanto nos vasos neoformados do mesmo. Apesar de menos intensa do que a marcação observada para a VN, a imunomarkação para α_v também foi observada nas paredes dos vasos próximos ao tumor. Um forte candidato para a ligação com a α_v é a subunidade β_3 . Diferentes trabalhos mostraram que a integrina $\alpha_v\beta_3$ contribui na invasão localizada de gliomas através da indução da expressão de enzimas proteolíticas. A integrina $\alpha_v\beta_3$ pode ligar-se à MMP-2 em um sítio diferente de RGD e serve para localizar a forma ativa da enzima na superfície dos vasos neoformados (ELICEIRI e CHERESH, 1999; WEI et al., 1996; BELLAIL et al., 2004). Além disso, o seu RNAm foi reportado como presente em tumores astrocíticos humanos, mas não em tecidos normais, como foi observado em C6 nas imunohistoquímicas aqui realizadas para a subunidade α_v .

4.5 Imunodeteção de moléculas envolvidas com a angiogênese

4.5.1 Imunodeteção de COX-2

Atualmente a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima responsável pela produção de prostaglandinas à partir de ácidos graxos poliinsaturados, tem sido relacionada com a progressão tumoral (TSUJII et al., 1997) e em gliomas humanos a sua expressão está diretamente envolvida com o aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2) e com o grau de anaplasia. A PGE2 pode ser gerada a partir do ácido araquidônico por duas

enzimas, a COX-1 e a COX-2. Em contraste com a COX-1, que é expressa constitutivamente em diversos tecidos, a COX-2 não é significativamente detectada em condições normais no cérebro exceto em subpopulações de neurônios, eventos inflamatórios e células tumorais. Diferentes trabalhos evidenciaram ainda que inibidores da ciclooxigenase suprimem também o crescimento tumoral (SANTORO et al., 1976; ARA e TEICHER, 1996; LEVY, 1997). As prostaglandinas têm sido relacionadas com diversos processos biológicos como a inflamação, doenças autoimunes e a oncogênese. A PGE2 e a PGF2 α podem aumentar a permeabilidade de microvasos periféricos e estão associadas a alterações na integridade da barreira hematoencefálica durante processos inflamatórios do SNC.

Shono et al. (2001) relacionaram em 66 gliomas humanos a expressão de COX-2 e o grau de anaplasia e mostraram que uma elevada expressão dessa enzima conota uma baixa sobrevida do paciente. Além disso, foi observado que a expressão de COX-2 em GBMs estava acumulada nas regiões das "células em paliçada", que circundavam as regiões necróticas do tumor, sugerindo que existe não apenas uma expressão constitutiva dessa enzima em tumores, como também uma possível indução da sua expressão por hipóxia e/ou por baixas concentrações de glicose (SHONO et al., 2001).

O modelo C6 aqui estudado foi particularmente apto a expressar a COX-2 como pode ser visto na **prancha 35**. A ciclooxigenase-2 (COX-2) apresentou uma expressão muito similar àquela observada para o VEGF (que será mostrada posteriormente). Identificou-se uma marcação mais intensa na região das células em paliçada, corroborando os resultados obtidos por Shono et al. (2001). Os sítios necróticos também apresentaram uma expressão considerável desta enzima. Nas áreas proliferativas, que correspondiam muitas vezes aos sítios de intensa angiogênese, a COX-2 foi expressa moderadamente, mas com algumas células isoladas de glioma fortemente marcadas (**Prancha 35 – Imagem H**). Além disso, os vasos tumorais foram aptos em expressar esta enzima consistentemente, e sua imunomarcação nestes sítios foi moderada. O tecido normal que circundava os tumores apresentou uma fraca expressão de COX-2, mas os vasos peritumorais, por sua vez, apresentaram uma expressão mais heterogênea que variou de fraca a moderada. Além disso, a COX-2 não foi observada na cicatriz glial dos tumores analisados.

O tipo celular que expressou a COX-2 no modelo C6 não pôde ser identificado apenas pelas observações das reações imunohistoquímicas, apesar dessas reações sugerirem fortemente uma expressão pelas células C6 das áreas necróticas e pelos vasos peritumorais. De fato, imunocitoquímicas analisadas em microscopia eletrônica de varredura

e realizadas pelo colega Juliano Miyake mostraram que a COX-2 foi expressa pelas células C6 de áreas necróticas e próximas a endoteliócitos, sua expressão foi observada ainda em endoteliócitos e neurônios (dados não publicados). Esses resultados corroboram dados apresentados por outros pesquisadores (MORITA et al., 1995; GREWAL et al., 2005). Deininger et al. (1999) identificaram a proteína de COX-2 tanto nas células tumorais, quanto nas células endoteliais de tumores humanos e experimentais. Em outro trabalho estes pesquisadores mostraram que tanto as células endoteliais do parênquima tumoral, quanto as células endoteliais das bordas do tumor C6 eram capazes de expressar COX-2 (MORITA et al., 1995; GREWAL et al., 2005; DEININGER et al., 1999; DEININGER e SCHLUESENER, 1999).

Embora a PGE₂ seja vastamente observada em gliomas, ainda não se pode afirmar qual o tipo celular é maior responsável pela sua produção. No cérebro normal a expressão de COX-2 foi identificada em alguns neurônios e pode ser regulada positivamente durante a inflamação em diversas células, como a microglia. Dado que a produção de PGE₂ dependente de COX-2 tem sido relacionada com a formação de edema em gliomas, Badie et al. (2003) sugeriram que a microglia teria um papel na formação deste edema via produção de COX-2. Usando o modelo *in vivo* de células C6 estes pesquisadores evidenciaram que o tumor C6 foi capaz de expressar COX-2 e esta produção poderia estar associada às células microgiais (BADIE et al., 2003, BAUER et al., 1997).

Nas lâminas analisadas no presente trabalho não foi possível identificar a expressão de COX-2 por esses tipos celulares (microglia) nem nos tumores, nem no tecido cerebral normal do hemisfério com o tumor e do hemisfério contralateral.

Por outro lado, as células C6 *in vitro* não expressam COX-2 e, na dissertação de mestrado da aluna Karina Lawrence Ramos, não foi observada a produção de PGE₂ por células C6 em cultivo (RAMOS, 2002; RAMOS e COLQUHOUN, 2003).

Nos tumores humanos (**Prancha 36**) a expressão de COX-2 foi heterogênea, com algumas células expressando essa enzima mais fortemente. Um fato interessante observado nos GBM's analisados foi que ilhas de células mais fortemente imunomarcadas puderam ser observadas nos diferentes fragmentos tumorais. A expressão de COX-2 foi nitidamente citoplasmática, como esperado. A marcação heterogênea de COX-2 observada nos tumores humanos foi similar àquela observada em alguns sítios do tumor C6.

4.5.2 Imunodetecção de VEGF

O VEGF foi intensamente expresso no modelo C6 aqui estudado (**Pranchas 35 e 37**). Observou-se uma forte marcação principalmente na região das células em paliçada e nas bordas do tumor, sítio de alta neoangiogênese (**Prancha 35, imagem C**). A expressão de VEGF também foi intensa nos vasos tumorais e em vasos do tecido normal adjacente ao tumor (**Prancha 35, imagens D e E**). A expressão deste fator de crescimento endotelial nas adjacências do tumor, principalmente na predita cicatriz glial, evidencia uma ação do VEGF muito além dos limites do tumor (**Prancha 35 - imagem E, prancha 37 – imagem B**). Em todos os animais foi observada uma forte marcação no tecido normal que circundava o tumor. Áreas de necrose também expressaram o VEGF intensamente (**Prancha 37 – imagem B**). Ambas imunomarcações, VEGF e COX-2, foram muito similares. Já no tecido normal do hemisfério cerebral que não recebeu o tumor a expressão de VEGF foi muito fraca. Esta baixa expressão poderia ser devida à uma limitação do método imunohistoquímico em detectar níveis muito baixos de VEGF. Além disso, diferentes trabalhos mostram que a expressão de VEGF é muito baixa em cérebros normais adultos e pode ser regulada positivamente no derrame e câncer. As análises cuidadosas das imunohistoquímicas para VEGF nos diferentes animais sugerem que esse fator de crescimento está associado às células tumorais, aos endoteliócitos dos vasos tumorais e peritumorais e à matriz extracelular tumoral. Dados de imunocitoquímica em microscopia eletrônica e realizadas pelo colega Juliano Miyake em nosso laboratório mostram inclusive a associação de VEGF tanto à matriz fibrilar, quanto não fibrilar nos tumores C6 (dados não publicados).

4.5.3 Imunodetecção dos receptores de VEGF: Flk-1 e Flt-1

Aliado aos resultados apresentados acima, onde foi averiguada a expressão de VEGF pelo tumor C6, foram realizados experimentos com o intuito de elucidar que receptores para esse fator de crescimento endotelial eram expressos pelo modelo C6. As **pranchas 37 e 38** mostram as imunohistoquímicas para Flk-1 e Flt-1 em dois diferentes animais. Como pode ser observado nas imagens, o glioma C6 foi apto em expressar tanto o Flk-1, quanto o Flt-1 no tumor. No entanto, a imunomarcação de Flt-1 foi muito mais intensa em C6 do que a de Flk-1 para todos os animais analisados. Trabalhos evidenciaram a expressão desses

receptores em GBMs e também em sítios de lesão, como cicatriz glial induzida pelo tumor (KRUM e ROSENSTEIN, 1998).

As análises das imunohistoquímicas para o receptor Flk-1 mostraram sua expressão na superfície das células C6 tanto no tumor, quanto nas suas bordas infiltrativas. As **pranchas 37 (Imagem E) e 38 (Imagem D)** mostram imunoreações para o Flk-1 em dois diferentes animais experimentais. Embora os vasos peritumorais tenham expressado este receptor moderadamente, o tecido normal mostrou uma expressão muito fraca de Flk-1 quando comparado com o controle negativo (**Prancha 37 - Imagem E, Prancha 38 - Imagem D**). Por outro lado, as células tumorais expressaram fortemente o Flk-1 (**Prancha 37 – detalhe da imagem E, Prancha 38 – detalhe da imagem D**). A expressão do Flk-1 na cicatriz glial dos tumores foi heterogênea e, em alguns sítios, muito fraca ou até mesmo ausente (**detalhe da imagem D, Prancha 38**). A **prancha 7** mostra a imunoreação para GFAP no mesmo animal experimental da **prancha 38** e pode ser usada como um indicador dos sítios de cicatriz glial neste animal. Células imunomarcadas para Flk-1 foram raras no tecido normal adjacente ao tumor e também no tecido normal do hemisfério contralateral dos animais analisados (**Prancha 37, imagem E**).

Além do Flk-1, os tumores C6 foram imunomarcados para outro receptor de VEGF, o Flt-1. Este receptor apresentou uma expressão intensa tanto nas bordas quanto nos centros tumorais de todos os tumores analisados. No entanto a expressão de Flt-1 em células dos centros proliferativos foi fraca (**Prancha 37 – imagem D, Prancha 38 – imagem C**). Tanto os vasos peritumorais quanto os vasos normais foram fortemente imunomarcados para este receptor. Os astrócitos reativos da cicatriz glial induzida pelos tumores expressaram este receptor heterogeneamente, mas essa expressão nos sítios de gliose foi menos intensa do que aquela observada no tumor e também no tecido normal circundante (**Prancha 37 – imagem D, Prancha 38 – imagem C**). A expressão de Flt-1 em alguns tumores foi intensa no limite do tumor com o tecido normal. Essa marcação coincidiu muitas vezes com a imunomarcação observada para o VEGF nas bordas do tumor, indicando uma provável sobreposição de expressão entre o receptor e seu ligante. As análises cuidadosas das imunohistoquímicas mostraram dois padrões de expressão para este receptor, um associado à superfície das células e outro permeando a matriz extracelular circundante e formando um extenso halo de marcação ao redor dos tumores (**Prancha 37 – imagem D**). De fato, os resultados de imunocitoquímica em microscopia eletrônica de transmissão (realizadas pelo colega Juliano A. Miyake) mostraram a expressão de Flt-1 na superfície das células C6, na superfície de endoteliócitos peritumorais e na matriz extracelular. Esses

dados conjuntamente indicam que o Flt-1 no tumor C6 se apresenta sob duas formas, como receptor de superfície e solúvel. O Flt-1 apresentou ainda uma forte expressão em células isoladas migrando por vasos tumorais e peritumorais. Estas células fortemente imunomarcadas puderam inclusive ser identificadas em sítios distantes do tumor (**Prancha 37 – imagem D, setas**). A **prancha 37** mostra células C6 imunomarcadas para Flt-1 e migrando por vasos peritumorais em 5 diferentes animais experimentais. Nas imagens observam-se células com características típicas de uma célula migrante tais como expansões citoplasmáticas. Observou-se ainda que na maioria dos tumores a migração por vasos era uma preferência em detrimento da migração pela matriz extracelular. Assim, pôde-se notar “trilhas” de células acompanhando os vasos peritumorais (**Prancha 39, imagem C**) e aglomerados de células C6 envolvendo os vasos neoformados e/ou peritumorais (**Prancha 39, imagem L**). Na **prancha 39** também é fácil identificar os dois padrões de expressão encontrados para o receptor Flt-1. Um padrão associado à superfície celular (**como o observado na imagem E**) e um padrão disperso na matriz extracelular (**imagens F, K, P e U**), o que sugere a expressão da isoforma solúvel da molécula no modelo aqui estudado.

As expressões de VEGF, Flk-1 e Flt-1 em C6 *in vitro* estão apresentadas na **prancha 40**. O VEGF foi expresso pelas células C6 em níveis baixos. De fato, o RNAm de VEGF foi identificado por outros autores distribuído pelo cérebro e co-localizado com a astrogliia e a microglia. A expressão de VEGF pelas células C6 indica a sua natureza astrocítica e uma expressão forte no tumor indica uma indução da expressão desse fator de crescimento *in vivo*. A indução da expressão de VEGF *in vivo* também é um indicador da influência de outras células presentes no tumor e no tecido normal sobre o metabolismo das células de glioma implantado.

Já as expressões de Flt-1 e Flk-1 apresentaram *in vitro* o mesmo padrão observado *in vivo*, uma maior imunomarcção de Flt-1 em relação a Flk-1. Este fato sugere que não é a indução do tecido do hospedeiro do tumor que levaria a um aumento na imunomarcção de Flt-1 e sim a natureza intrínseca das células C6.

Nos tumores humanos testados, tanto o VEGF quanto o Flk-1 foram eficientemente marcados. O Flt-1, por sua vez, não pôde ser encontrado nos dois GBMs testados. As imunomarcações para essas moléculas estão apresentadas na **prancha 41**. Esses resultados condizem com o que tem sido descrito na literatura acerca da expressão de VEGF, Flk-1 e Flt-1. Diversos trabalhos mostram que GBMs são capazes de expressar esses receptores. Yao et al. (2001) mostraram que 94% dos tumores humanos por eles

analisados expressaram VEGF, 52% expressaram Flt-1 e 78% expressaram o Flk-1. Outros trabalhos mostram ainda que a expressão de Flk-1 está correlacionada com a malignidade de gliomas.

Uma discussão mais detalhada dessas moléculas envolvidas com a angiogênese tumoral será dada abaixo no tópico discussão global.

4.6 Imunodeteção de enzimas proteolíticas

4.6.1 MMP-2 e MMP-9

A **prancha 42** mostra a expressão de MMP-2 em 3 diferentes animais experimentais. O MMP-2 foi fortemente expresso em todos os animais analisados. Sua expressão foi restrita ao tumor e não foi detectada no tecido normal circundante ou na cicatriz glial induzida pelo tumor. A expressão da MMP-2 foi observada tanto no centro tumoral quanto em suas bordas e sua distribuição nos tumores como um todo pode ser observada nas **pranchas 37 (imagem C) e 38 (imagem B)**. Uma forte imunoreação para MMP-2 também foi observada nas células C6 que migravam ao longo de vasos peritumorais (**Prancha 37 – detalhe da imagem C, Prancha 43**). Muitas dessas células apresentaram características de células migrantes, com o corpo celular nitidamente polarizado, presença de expansões citoplasmáticas e ancoragem na superfície abluminal dos vasos (**Prancha 43**). Em algumas imagens a morfologia das células sugere que endoteliócitos de vasos peritumorais também são hábeis em expressar a MMP-2. Contudo, a maioria das células observadas associadas a vasos peritumorais apresentavam uma morfologia mais condizente com a de células de glioma C6, com núcleos arredondados e sem o aspecto pequeno e fusiforme típico dos endoteliócitos observados. A expressão de MMP-2 também observada em alguns vasos peritumorais confirma o papel dos endoteliócitos conjuntamente com as células de glioma na degradação da MEC circundante.

O padrão de marcação de MMP-2 apresentou ainda uma particularidade, sua expressão pôde ser observada tanto na superfície das células, quanto na MEC que circundava essas células (**Prancha 44**). A análise das lâminas também sugere a expressão de MMP-2 no citoplasma das células tumorais. Esse padrão de expressão é condizente com a ligação da MMP-2 à superfície da célula para sua ativação. Como foi citado na introdução, a ativação da MMP-2 depende da interação dessa à MT1-MMP que está na superfície da

célula. Num processo também mediado pela integrina $\alpha v\beta 3$ e pela TIMP-2 a MMP-2 é ativada e liberada para a matriz extracelular. Convém ressaltar aqui que o anticorpo usado nesse trabalho é capaz de reconhecer tanto a MMP-2 não ativa, quanto aquela ativada. Por esse motivo a marcação da MMP-2 na superfície celular e na matriz extracelular pôde ser imunodetectada. Em estudos com hibridização *in situ* foi mostrado que em GBMs humanos a MMP-2 e a MT1-MMP são expressas principalmente pelas células de glioma, mas a expressão do RNAm de MMP-2 também pode ser encontrada na glia, endotélio e neurônios.

A MMP-9 por sua vez é expressa por células endoteliais em proliferação (BELLAIL et al., 2004). No entanto, o modelo C6 não expressou a MMP-9, dado esse confirmado pela ausência de imunomarcção nas imunohistoquímicas e também pela expressão negativa do RNAm dessa enzima proteolítica em gliomas C6 *in vivo* (resultado obtido por RT-PCR por Marcel Benadiba em nosso laboratório – dados não publicados). Por outro lado, os dois GBMs humanos analisados apresentaram a expressão tanto de MMP-2, quanto MMP-9 (**Prancha 45**). No entanto, o número de células imunomarcadas para MMP-9 foi muito mais menor quando comparada ao número de células marcadas para MMP-2. Ambas MMPs foram expressas em sítios com alta celularidade num padrão que sugeriu as suas deposições na matriz extracelular. Contudo, no contexto geral dos fragmentos analisados, a expressão de ambos foi muito mais heterogênea, com algumas áreas bem marcadas e outras não, do que foi observado no glioma de rato C6. Esses dados sugerem que em C6 a MMP-2 parece exercer um papel muito mais importante na degradação da MEC circundante e provavelmente substitui a MMP-9 nesse processo. Além disso, apesar de não ter sido imunomarcada, acredita-se que a MT1-MMP também apresentaria um papel chave na degradação proteolítica deste modelo. A forte e homogênea expressão de MMP-2 em C6 em contraste com a expressão mais dispersa nos tumores humanos sugere ainda uma grande homogeneidade na população de células tumorais aqui estudadas. Convém ressaltar que testes de zimografia foram realizados em nosso laboratório e comprovam que no modelo C6 *in vivo* a MMP-2 encontra-se ativa e a MMP-9 não é expressa (dados obtidos pela Profa. Dra. Alison Colquhoun).

4.7 Discussão global

4.7.1 A organização pericelular dos elementos de matriz extracelular no modelo C6

Todos os resultados obtidos até o momento permitem a criação de um padrão de marcação para as moléculas analisadas. As duas grandes vantagens da técnica de imunohistoquímica aqui usada são: a possibilidade de confirmação da expressão protéica da molécula, assim como a sua localização topográfica nas diferentes regiões do tumor implantado. A precisa localização da expressão de cada molécula em tumores tão setorizados e heterogêneos como os GBMs é uma premissa para a compreensão dos processos envolvidos na disseminação desta neoplasia. Ainda hoje a metodologia mais usada por neuropatologistas para a caracterização de tumores cerebrais é a análise histoquímica, ferramenta indispensável no diagnóstico. Aliado a isso, e como será discutido a seguir, um grupo seletivo de células parecem ser as grandes responsáveis pela reincidência da doença e sua baixa prognose. As células migrantes e infiltrativas das bordas dos tumores são o grande alvo no estudo de GBM's, mas a caracterização dos padrões de expressão de moléculas envolvidas com seu fenótipo invasivo em um único modelo são escassas na literatura, ou são subvalorizadas em metodologias que estudam o tumor como uma massa celular homogênea.

O modelo C6 apresentou diversas características de um GBM pleno como áreas de necrose, zonas proliferativas, bordas infiltrativas, células em paliçada, atípicas nucleares e a migração e invasão preferencial por vasos. O estudo aqui apresentado permitiu a análise da distribuição geográfica da expressão de cada uma das moléculas analisadas nesses setores tumorais. A **tabela 6** apresenta um resumo das distribuições das marcações de todas as moléculas aqui estudadas.

Como citado na introdução, o parênquima cerebral apresenta uma composição de MEC muito peculiar, rica em proteoglicanas e ácido hialurônico e pobre em colágenos e glicoproteínas que se concentram nas membranas basais dos vasos. Esse padrão de distribuição dos elementos de matriz no tecido cerebral é o maior indutor da migração por vasos observada nos GBMs. As membranas basais são os reservatórios de FN, laminina, colágeno tipo IV e VN do cérebro. Essas membranas basais apresentam uma provável origem mista, sendo parcialmente depositadas pelos endoteliócitos e parcialmente pelos astrócitos. Lembremos aqui que devido à presença da barreira hematoencefálica há uma

íntima associação entre esses dois tipos celulares. Contudo, o modelo C6 de GBM de rato mostrou-se apto em compensar a pobreza em elementos de MEC permissíveis à migração ao expressar diversos desses elementos. Com citados nos resultados acima, o tumor C6 *in vivo* foi muito eficiente na expressão de vitronectina (VN), fibronectina (FN), tenascina-C (TN-C), colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, versican, brevican e agrecan. A expressão de todos esses elementos de MEC conjuntamente não havia sido estudada antes em um mesmo modelo de GBM. As expressões tumorais dessas proteínas complementarizam a MEC disponível para o tumor. Mas a análise cuidadosa das reações imunohistoquímicas apresentou algumas características interessantes para cada uma delas.

Dentre as glicoproteínas estudadas (TN-C, TN-R, VN, FN) apenas a TN-R não foi expressa pelo tumor C6. A VN e FN foram fortemente expressas pelo tumor e ambas compartilharam os mesmos sítios tumorais, com uma expressão intensificada nas bordas infiltrativas e células isoladas migrando pelos vasos tumorais. Ambas apresentaram uma expressão aumentada em tumores morfologicamente invasivos (com focos multicêntricos, ou com migração intensa pelas fibras mielinizadas). Contudo, o que chamou a atenção foi que em muitas das células isoladas migrando por vasos peritumorais a expressão dessas glicoproteínas foi pericelular e não apenas permeada na MEC circundante, como foi observado no centro do tumor. Isto é, as células mais invasivas do tumor parecem criar um microambiente pericelular de elementos de MEC permissíveis à migração.

Tanto a VN quanto a FN podem ser reconhecidas pela integrina $\alpha_v\beta_1$. Essa integrina foi eficientemente expressa pelo modelo C6, suas subunidades foram fortemente expressas nas bordas dos tumores e em células isoladas migrando pelos vasos peritumorais, num padrão muito similar àquele observado para a VN e FN. No caso da subunidade α_v essa expressão associada a vasos foi identificada até mesmo em sítios muito distantes do tumor, o que sugere uma habilidade ímpar das células C6 em infiltrarem-se no tecido normal adjacente à neoplasia utilizando os vasos como trilhas de migração. Já a subunidade β_1 foi observada em células C6 associadas a vasos bem próximos do tumor. A ausência da expressão da subunidade β_1 nos sítios distantes observados para a subunidade α_v sugere ainda que outras integrinas poderiam estar envolvidas no reconhecimento da FN e VN nesses sítios. Uma forte candidata é a integrina $\alpha_v\beta_3$ que apresenta um comprovado papel na indução da angiogênese em tumores (MIZEJEWSKI, 1999), porém a subunidade β_3 não foi estudada no presente trabalho.

A expressão pericelular de ambas glicoproteínas, VN e FN, poderia ser explicada de duas formas: (1) ou a sua expressão e liberação pelas células C6 é contínua, mantendo um

suprimento de glicoproteínas próximo à superfície da célula para a indução da migração via ligação com suas integrinas específicas, (2) ou há algum tipo de ancoramento dessas moléculas à superfície das células C6 permitindo a adesão necessária à migração.

Os agrupamentos de integrinas, ou adesões focais, mediam a ligação entre os elementos de MEC extracelulares e os filamentos de actina intracelulares que, por sua vez, interferem na forma final da célula. A ligação dessas glicoproteínas a uma integrina específica, como a $\alpha_v\beta_1$, pode induzir as cascatas de sinais responsáveis pelo estímulo da proliferação e migração. Essas cascatas podem apresentar uma ação conjunta com fatores de crescimento, citocinas ou ainda ativar cascatas de quinases como a FAK. Essa última está relacionada com ativação de proteínas-G e tirosinas quinase da família *src*.

Como mostrado por Uhm et al. (1999a) a VN apresenta uma ação anti-apoptótica em astrocitomas, já que a integrina $\alpha_v\beta_1$ induz a expressão de BCL-2 e BCL-X nesses tumores (UHM et al., 1999). Além disso, Bafetti et al. (1998) mostraram que a VN pode induzir a expressão de MMP-2 numa via mediada pela integrina $\alpha_v\beta_3$ em melanomas. A indução da expressão de MMP-2 por sinalização de integrinas foi também mostrada por Hu et al. (2006) em células de glioma. Nesse trabalho os autores mostraram que a indução da via de sinalização da integrina $\alpha_v\beta_1$ (via FAK, p130^{Cas}, ERK 1, ERK 2 e JNK) por angiopoietina 2 pode levar à expressão e ativação da MMP-2. Assim a manutenção da expressão de VN poderia interferir no balanço adesão versus degradação indispensáveis à movimentação celular. A disponibilidade da VN para a sinalização via integrinas poderia ser facilitada se este elemento de MEC fosse seqüestrado para a superfície da célula de glioma. De fato, a VN apresenta sítios de ligação com outros elementos de MEC como os colágenos e glicosaminoglicanas (SCHVARTZ et al., 1999), e poderia assumir uma posição pericelular ao se ligar a esses elementos que também podem, indiretamente, se ligar à superfície celular. As enzimas proteolíticas seriam nesse cenário o ponto chave para a disponibilização da VN para a sua ligação com seus receptores específicos.

A FN também é associada a uma indução da migração e proliferação em células de glioma. A expressão pericelular da FN já havia sido descrita anteriormente por Halfter et al. (1989). Assim como a VN, a FN também possui sítios de ligação com outros elementos de MEC como colágenos e glicosaminoglicanas. Apesar da pobreza de colágenos no cérebro adulto de ratos, os colágenos tipo I, tipo III e tipo IV foram expressos pelas células C6 *in vivo*. Como o parênquima cerebral é pobre em elementos de matriz fibrilar então esses colágenos seriam os principais pontos de ancoragem das células migrantes, portanto candidatos para a indução da migração em sítios infiltrativos. O tumor usaria tanto o

colágeno de origem endógena, quanto aquele presente nas membranas basais dos vasos no processo migratório. Contudo, a expressão de colágenos observada nos tumores foi bem maior do que aquela dos vasos peritumorais, o que sugere que o colágeno exógeno não é suficiente na manutenção do fenótipo migratório de C6 *in vivo*. Os colágenos já foram descritos como indutores da migração em gliomas, em especial o colágeno tipo I. Interessantemente o colágeno tipo I apresentou uma expressão aumentada em subpopulações de células C6 das bordas infiltrativas e muitas dessas células encontravam-se associadas a vasos peritumorais. Como já citado, esse mesmo padrão de expressão foi observado para VN e FN o que poderia sugerir uma ligação dessas glicoproteínas com os colágenos sintetizados pelas células, principalmente o colágeno tipo I.

Contudo, além da FN, VN e colágeno tipo I, outro elemento de matriz, o versican, foi observado num padrão pericelular nas células das bordas infiltrativas e nas células C6 associadas a vasos peritumorais. O versican é uma proteoglicana ligante de ácido hialurônico, assim como outras hialaderinas aqui estudadas, o agrecan e o brevican. Essas proteoglicanas, em virtude das glicosaminoglicanas associadas a sua estrutura, são responsáveis por uma hidratação do meio extracelular e por uma maior permissividade à migração. O ácido hialurônico é uma glicosaminoglicana de cadeia muito longa e abundantemente expressa no parênquima cerebral. Sua expressão apresenta uma íntima relação com a capacidade invasiva de gliomas (vide introdução). Na formação das redes perineuronais, que são os principais reservatórios de MEC no parênquima cerebral as ligações entre o ácido hialurônico e o brevican, versican e agrecan formam teias hidrofílicas que permeiam os espaços extracelulares. Esses elementos podem ser reconhecidos pela célula e ligam-se à sua superfície via receptores específicos. Dois receptores de ácido hialurônico foram analisados no presente trabalho, o CD44 e o RHAMM. As análises das expressões desses receptores sugerem fortemente que no modelo C6 o RHAMM apresenta um papel mais importante na sinalização induzida por ácido hialurônico que o CD44. Além de ser encontrado na superfície celular, o RHAMM pode também ser internalizado e associar-se a microtúbulos do fuso mitótico interferindo na proliferação celular. Contudo a ação mais descrita desse receptor parece ser sobre a motilidade celular.

Interessantemente o versican também apresenta um sítio de ligação com o CD44 via seu domínio semelhante à lectina (domínio CRD), contudo a baixa expressão do CD44 no modelo C6 sugere que essa interação pode não ter um papel chave no metabolismo migratório do tumor. Contudo, o domínio CRD parece ser um forte candidato para a interação da molécula de versican à superfície da célula.

Além disso, a ligação do versican, via domínio G1, ao ácido hialurônico e do ácido hialurônico ao RHAMM poderia justificar a expressão pericelular do versican nas células altamente infiltrativas do modelo C6. No SNC é comum a co-localização do versican com a TN-R e ácido hialurônico e as glicosaminoglicanas da molécula de versican também podem se associar à FN (WU et al., 2001). Contudo, o versican pode ligar-se ainda à subunidade β_1 das integrinas como foi descrito por Wu et al. (2002). De fato, a expressão da subunidade β_1 nos tumores C6 *in vivo* foi similar àquela observada para o versican. Em diferentes trabalhos Wu et al. mostraram que células de astrocitoma transfectadas com o gene de versican mutado (sem domínios EGF) apresentavam um aumento na expressão da subunidade β_1 e que o versican era capaz de ligar-se à essa subunidade de integrina de forma RGD-independente. A expressão do versican mutado fez a linhagem perder suas características tumorais interferindo no crescimento ancoragem-independente do tumor. Além disso a expressão do versican mutado inibiu a secreção do versican endógeno que, ao ligar-se à superfície celular, é capaz de aumentar a proliferação de células U87. Esses dados evidenciaram um papel do versican sobre a proliferação de astrocitomas e sugerem que os domínios EGF da molécula são importantes na manutenção do fenótipo maligno de astrocitomas (WU et al., 2002, WU et al., 2004). Este dado sugere que em gliomas o receptor de EGF, o EGFR, poderia ter um papel nessa manutenção. Além disso, em diversos tipos celulares as próprias integrinas podem ativar o receptor de EGF. Essa ativação cruzada geraria respostas diversas, dado que ambas vias de sinalização, das integrinas e do EGFR, podem compartilhar intermediários. A ativação do EGFR via integrinas pode, entre outras prováveis funções, controlar a característica ancoragem-independente de diversos tumores (PRENZEL et al., 2000). Assim as sinalizações via integrinas e via receptor de EGF poderiam trabalhar conjuntamente no metabolismo dos astrocitomas. A ligação pericelular do versican à superfície da célula poderia ser vantajosa ao tumor por diversas razões como, por exemplo, na disponibilidade de domínios EGF.

As proteoglicanas são moléculas muito versáteis e o versican poderia ainda ser um ponto de ancoragem a outros elementos de MEC. A ligação entre versican e FN poderia inclusive ser uma forma de proteger fatores de crescimento da degradação proteolítica, ou até mesmo agir como um complexo indutor de angiogênese. Zheng et al. (2004) mostraram que células de astrocitomas (U87) transfectadas com o domínio G3 do versican (domínio semelhante à EGF) desenvolveram tumores até 10x maiores em ratos nude do que células transfectadas apenas com vetor. Além disso, células endoteliais cultivadas com o sobrenadante obtido do cultivo de células U87 transfectadas apresentaram uma maior

proliferação e migração. Os autores observaram ainda um aumento nas expressões de FN e VEGF nos tumores injetados tanto na MEC quanto no citoplasma das células. Contudo, um dado interessante obtido pelos autores foi a imunoprecipitação de versican, FN e VEGF. Interessantemente o uso de anticorpos anti-FN levou à uma queda da expressão das três moléculas. Assim, o domínio G3 de versican seria responsável pela indução da expressão de FN e VEGF em astrocitomas, mas sua forma de indução ainda não pôde ser esclarecida.

O complexo Versican / FN / VEGF poderia também induzir a angiogênese. A ligação do versican à superfície celular poderia ancorar, via FN, o VEGF na superfície celular, mantendo esse fator de crescimento disponível para os receptores celulares. Como será visto adiante, o VEGF provavelmente é utilizado tanto pelas células endoteliais quanto pelas próprias células tumorais para a indução de sua proliferação. O ambiente tumoral está permeado de enzimas proteolíticas, no caso de C6 a MMP-2 foi consistentemente expressa. O seqüestro de moléculas de VEGF para a superfície celular poderia ser uma forma de proteger esse fator de crescimento da degradação proteolítica. Ao mesmo tempo, o balanço entre VEGF e MMP-2 poderia ditar a disponibilidade desse fator de crescimento para o meio. O VEGF foi fortemente expresso nas bordas do tumor e também no tecido normal que o circundava, tecido esse de intensa remodelação devido à instalação da cicatriz glial e à produção de MMPs pelo tumor. Contudo, não esqueçamos que a própria FN apresenta um papel de indução proliferativa via sinalização por integrinas. Sua rápida disponibilização para a célula também pode exercer um papel na indução da angiogênese tão importante na migração de células de glioblastoma multiforme. A forte expressão de MMP-2, principalmente nas células infiltrativas das bordas do tumor C6 *in vivo*, assim como a sua ativação na superfície celular, indicam um papel dessa enzima proteolítica não apenas na simples degradação de MEC, mas na exposição de sítios crípticos e liberação de sítios bioativos das moléculas.

Interessantemente outro fator de crescimento que poderia ter um papel chave no metabolismo das células C6 é o EGF. Alguns dos elementos de MEC aqui estudados apresentam domínios semelhantes à EGF em sua estrutura e trabalhos mostram que esses domínios podem exercer a função de EGF quando liberados por digestão proteolítica. Esses domínios bioativos de elementos de matriz extracelular são coletivamente chamados matriquinas e um bom exemplo de glicoproteína com domínios bioativos é a TN. Como evidenciado por Swindle et al. (2001), os domínios semelhantes à EGF da TN-C podem induzir a mitogênese de uma forma dependente de EGFR. A ligação não apresenta uma alta afinidade quando comparada à ligação da molécula de EGF solúvel, isso porque os

domínios da TN-C semelhantes à EGF não apresentam a segunda volta da estrutura quaternária molécula de EGF que é, por sua vez, requerido na ligação de alta afinidade. Contudo, há uma “vantagem” nessa ligação com afinidade diminuída, já que o domínio semelhante à EGF pode ligar-se e também desligar-se do receptor mais facilmente o que impede a sua internalização e conseqüente degradação. Esses domínios semelhantes a EGF não apenas ativam o receptor EGFR como induzem eficientemente a via de sinalização da MAP quinase (SWINDLE et al., 2001).

Além de fornecer elementos bioativos, a TN-C também poderia agir na indução da angiogênese via VEGF. As análises estatísticas das expressões de TN-C perivascular e VEGF em GBMs mostraram que ambas moléculas parecem colaborar com o aumento da densidade microvascular dos vasos (BEHREM et al., 2005). Tanto a TN-C quanto o VEGF foram expressos pelo tumor C6 *in vivo*. O VEGF foi fortemente expresso nas células infiltrativas e associadas a vasos e também formou um extenso halo ao redor do tumor, permeando o tecido normal circundante. A TN-C por sua vez apresentou uma expressão mais restrita às bordas infiltrativas e associada às células que migravam por vasos peritumorais. Trabalhos mostram que a TN-C intercelular pode ser associada com a proliferação e sua produção pode ser de origem tumoral ou endotelial (BEHREM et al., 2005). Essa glicoproteína poderia agir de forma anti-adesiva no endotélio, soltando células do vaso mãe e induzindo a angiogênese. Sua ação nos vasos seria via integrinas endoteliais como a $\alpha_2\beta_1$, que é essencialmente adesiva, e via a $\alpha_v\beta_3$, que nos vasos apresenta um papel anti-adesivo. Além disso a TN-C é responsável pela modulação de bFGF no início da angiogênese. Interessantemente em uma linhagem de GBM (T98G) a proliferação é estimulada por TN-C na presença de FN, contudo a TN-C e a FN podem competir pela adesão à superfície celular (HUANG, 2001). O modelo C6 *in vivo* foi apto em expressar a FN.

A expressão da TN-C no tumor foi restrita a algumas células das bordas infiltrativas da neoplasia. Mesmo não apresentando uma imunomarcacão mais distribuída pelo tumor, essa glicoproteína poderia ser uma indutora da migração nos sítios onde foi expressa. Lembremos novamente que as maiores responsáveis pela reincidência dos GBMs são poucas células isoladas e infiltradas no tecido normal. Ao que tudo indica a TN-C é uma candidata à indução da infiltração, muitas vezes associada à vasos, das células tumorais no tecido normal. Células C6 imunomarcadas para TN-C foram constantemente observadas associadas a vasos peritumorais de médio e pequeno calibre. Além disso, as fortes expressões de VN e FN sugerem que essas glicoproteínas também teriam um papel chave

na migração/invasão ativa de C6. Ambas foram observadas com uma imunomarcacão intensa em células associadas a vasos peritumorais. As três moléculas são ainda relacionadas com a indução da proliferação em gliomas. A habilidade de algumas poucas células produtoras de TN-C, FN e VN migrarem para sítios distantes do tumor, aliado ao fato dessas células proliferarem nesses novos nichos, seria suficiente para a reincidência da doença.

Outro padrão observado no presente trabalho foi a expressão muito baixa ou até mesmo ausente de diversas proteínas analisadas nas áreas proliferativas do tumor (vide a tabela 3). Mesmo moléculas cujas expressões foram muito intensas nos tumores observados (como a VN, a FN, o colágeno tipo I e o versican) apresentaram baixas imunomarcações em sítios proliferativos. Como já foi citado todas essas moléculas são candidatas na indução da habilidade infiltrativa de C6.

O tratamento convencional de GBMs consiste na retirada cirúrgica do tumor (quando possível) seguida de tratamentos adjuvantes como a radioterapia e mais recentemente a quimioterapia. Quase a totalidade dos quimioterápicos usados, entre eles a Vincristina, Temozolomida (Temodal®) e Carmustina (BCNU), são anti-proliferativos, isto é, apresentam citotoxicidade contra células em divisão (STUPP et al., 2006; REARDON e WEN, 2006). Mas a ação desses quimioterápicos associados à radioterapia em GBMs mostrou-se pouco eficaz e levou apenas a um discreto aumento da sobrevida dos pacientes (de 12 para 15 meses pós-cirurgia). Contudo, como mostrado no presente trabalho, as principais responsáveis pela reincidência do tumor são células que estão em plena migração, e não em divisão.

Como mostrado por Farin et al. (2006) a partir do primeiro dia pós implante o tumor C6 infiltra o tecido normal migrando preferencialmente pelos vasos. Os prolongamentos das células tumorais se intercalam com os pés vasculares dos astrócitos nas células endoteliais. Os vasos peritumorais observados por esses pesquisadores foram extensivamente permeados com células C6 e houve até o desprendimento dos prolongamentos dos astrócitos normais da parede dos vasos. Contudo, o que chamou a atenção é que as células C6 migravam de forma saltatória e se dividiam *en route* nesse processo (FARIN et al., 2006). Assim células em migração não se dividem durante este processo, elas precisam parar a movimentação para proliferar. Interessantemente os autores observaram que existiam pontos nos vasos que apresentavam um maior número de células em divisão, como se estas apresentassem uma preferência em parar e dividir em certos sítios. Essas áreas de divisão em geral apresentavam-se próximas das ramificações dos vasos. A

composição da MEC nesses pontos poderia ser uma justificativa, entre outras possibilidades, para a indução da proliferação de C6 *en route*. Contudo a razão do porquê as células C6 apresentam uma preferência em migrar por esses sítios é ainda desconhecida.

O que os resultados de Farin et al. (2006) e do presente trabalho indiretamente sugerem é que as células de GBM em migração provavelmente não são afetadas pelos tratamentos quimioterápicos anti-proliferativos convencionais. Como mostrado na presente discussão, justamente as células com expressões mais intensas de diferentes elementos de MEC, que são as células migrando ativamente por vasos, não seriam afetadas por quimioterápicos, o que justificaria em parte a quimioresistência dos GBMs e a sua reincidência de quase 100%.

Uma outra variável deve ser levada em conta quando discutimos os procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos dos GBMs. Como citado na introdução o tumor pode levar à indução de cicatriz glial. No trabalho aqui apresentado a maioria dos tumores apresentou a indução de cicatriz glial, apesar desta não ter sido homogênea entre os tumores. A GFAP foi utilizada como um marcador eficiente das áreas de gliose nos tumores estudados. Dentre as moléculas estudadas algumas apresentaram uma aumentada imunomaração em comparação com o tecido normal como, por exemplo, a TN-R, VEGF e RHAMM. Além disso, moléculas como o colágeno tipo I, colágeno tipo IV, VN, FN, VEGF, flt-1 e flk-1 foram intensamente imunomarcadas nos vasos peritumorais que muitas vezes estavam inseridos nas regiões de gliose.

Um fato interessante e observado nos cortes seriados dos animais estudados é que o sítio de injeção estereotóxica induz à formação de uma cicatriz glial mais intensa que aquela induzida pelo tumor. E uma forte imunomarcção de TN-R e RHAMM pôde ser observada nesses sítios.

Lembremos aqui que a principal abordagem no tratamento dos GBMs ainda é a extração cirúrgica, quando possível. Dada a natureza altamente invasiva e infiltrante destes tipos de tumores, há atualmente discussões sobre como a ressecção cirúrgica agressiva (o procedimento terapêutico mais usado) é traduzida em um aumento na sobrevida do paciente. Quigley e Maroon (1991) revisaram 20 trabalhos, envolvendo mais que 5600 pacientes tratados num período de 30 anos, e em apenas 4 trabalhos encontrou-se uma correlação positiva entre a ressecção cirúrgica e a sobrevida. Assim, o procedimento cirúrgico não tem como mote a cura da doença e sim a minimização de efeitos colaterais como o aumento da pressão intracraniana e a lesão neurológica. Mesmo no caso de

extirpação macroscópica radical do tumor (como em hemisférioectomias) há a reincidência da doença. Esta reincidência dá-se preponderantemente no sítio de ressecção (em 90% dos casos) na região onde estão presentes os astrócitos reativos proximais. Além disso, muitos pacientes apresentam astrocitomas reincidentes muito mais agressivos que o tumor primário, sugerindo que talvez o microambiente da cicatriz glial induzida no processo cirúrgico possa estimular a progressão maligna das células tumorais remanescentes.

Juntamente com a liberação de diversos fatores séricos, como por exemplo, fatores de crescimento, os astrócitos reativos induzem uma alteração histopatológica intensa na área da cicatriz: uma profunda mudança na composição da matriz extracelular (MEC) local (STICHEL e MULLER, 1998). Como citado na introdução, o trauma cirúrgico leva a alterações biológicas extensas e a formação de cicatrizes gliais, com a liberação de mitógenos, indução de uma extensa vascularização, expressão de elementos de MEC diferentes e proliferação de astrócitos reativos. Por exemplo, fatores de crescimento como FGF e fatores de crescimento semelhantes à insulina são produzidos na região da cicatriz e induzem a proliferação de gliomas (HAMEL e WESTPHAL, 2000). Segundo Stichel e Muller (1998) algumas das moléculas que aparecem como sendo mais expressas no sítio da cicatriz (produção *de novo*) são: o colágeno IV, a laminina, a FN, a VN e uma grande gama de proteoglicanas. No modelo C6 nenhuma dessas moléculas foi intensamente imunomarcada permeando a MEC da cicatriz glial, mas o colágeno tipo I, o colágeno tipo IV, a VN e a FN apresentaram uma indução na sua expressão nas membranas basais dos vasos peritumorais inseridos na área de gliose.

A MEC na cicatriz glial é uma estrutura dinâmica e representada preponderantemente pela deposição de elementos de membrana basal (TIMPL e DZIADEK, 1986). A membrana basal apresenta a função de aproximar as margens da lesão a fim de reduzir a cavidade lesionada e permitir a reconstrução tecidual. Contudo, apesar da composição da membrana basal ser bem conhecida em outros tecidos (rins e tumores) a sua composição detalhada ainda é desconhecida no SNC normal e em situações como a gliose.

Segundo a literatura entre as proteoglicanas identificadas no sítio de gliose reativa temos o brevican, que é super-expresso na sua forma secretada em ratos submetidos à lesão cerebral; sugerindo assim um papel desta proteoglicana na motilidade glial (THON et al., 2000; JAWORSKI et al., 1999). A presença de elementos na cicatriz glial não permissíveis à migração de neurônios, como algumas glicosaminoglicanas, pode significar um estímulo para a célula tumoral proliferar, dado que células em pleno processo de migração em geral não se dividem. Lembremos que a não imunomarcagem das

proteoglicanas aqui estudadas nas cicatrizes gliais do modelo C6 não necessariamente significa que elas não foram expressas. Como citado nos resultados acima (tópico 3.4) a metodologia aqui usada pode não ter sido eficiente na exposição dos epítomos do eixo protéico das moléculas, o que dificultou o reconhecimento pelos anticorpos.

Além disso, estímulos angiogênicos levam a uma proliferação e migração endotelial intensa (até duas vezes maior que no tecido normal) em situações de gliose. De fato, como pode ser observado nas diferentes foto-montagens do presente trabalho, há uma intensa angiogênese nas áreas relativas à cicatriz glial induzida pelos tumores. Dado que as células mais invasivas do tumor C6 apresentam a preferência em migrarem associadas aos vasos peritumorais, então o estímulo de angiogênese na cicatriz glial seria um indutor indireto da invasão/migração tumoral. A expressão de VEGF, Flt-1 e Flk-1 nesses sítios de angiogênese sugere ainda que não apenas as células C6, mas também os astrócitos reativos estariam contribuindo para angiogênese e, portanto, para a infiltração do tumor.

Contudo nenhum trabalho procurou relacionar se o ambiente da cicatriz glial resultante da interferência cirúrgica poderia gerar condições ainda melhores para a sobrevivência destas células tumorais remanescentes, dado que a maioria dos trabalhos sobre astrogliose focam-se especificamente na regeneração axonal.

4.7.2 A expressão de VEGF, Flt-1, Flk-1 e COX-2 no modelo C6: uma nova visão para moléculas antigas

A angiogênese é um processo multi-passos complexo que envolve: (1) a produção e secreção de fatores de crescimento, (2) a degradação enzimática de lamina basal do vaso precursor e a degradação da MEC circundante, (3) a formação de um “broto” de vaso, (4) a proliferação das células endoteliais e a sua migração direcional e (5) a formação do tubo vascular final (KAUR et al., 2004). Esse processo é controlado por um balanço homeostático entre fatores angiogênico-estimulantes e fatores angiogênicos-inibitórios e, exceto sob certas condições fisiológicas e patológicas, acontece durante o desenvolvimento. No sistema nervoso central de adultos a angiogênese acontece principalmente sob condições de hipóxia/isquemia que podem ser resultantes de infecções ou derrame (ZADEH e GUHA, 2003). Dada a importância desse processo no crescimento dos tumores sólidos, muitos trabalhos focam-se no estudo das expressões de diferentes moléculas envolvidas no processo angiogênico de GBMs tanto *in vitro* quanto *in vivo*, (YAO et al., 2001; KE et al., 2002; PLATE e RISAU, 1995). A neovascularização de gliomas aparentemente não é

dependente da "massa crítica" do tumor, já que é iniciada por eventos moleculares e sinalizações célula-célula nas primeiras 24 horas do crescimento tumoral. Tumores com apenas poucos milímetros já são angiogênese-dependentes. Contudo, muitos trabalhos se focam no papel das proteínas angiogênicas na proliferação e migração dos vasos *per se* e não nas suas ações sobre as células tumorais. Por outro lado, um crescente número de pesquisas sugerem que a angiogênese estaria mais relacionada à proliferação, migração e invasão das células tumorais do que à oxigenação e nutrição destas. Esta observação é sustentada pela presença de vasos trombosados ao redor e dentro da massa tumoral o que indica um fluxo sanguíneo comprometido (RAZA et al., 2002). Como mostrado por Farin et al. (2006), as células C6 *in vivo* podem migrar ao longo da superfície abluminal dos vasos, mas aparentemente não invadem a luz do vaso. Os autores observaram que estas células migraram num padrão saltatório e foram capazes de proliferar neste percurso, parando para dividir

Com o intuito de mostrar esse padrão de migração associado a vasos, Goldbrunner et al. (1997) implantaram esferóides (200µm) de células de glioma humano no córtex de ratos atímicos. Notou-se que os endoteliócitos do hospedeiro migraram para o interior do tumor uniram-se e formaram novos vasos; acrescido a isso a vasculatura do hospedeiro sofreu uma considerável extensão com uma concomitante formação microvascular. As células de gliomas passaram então a usar os vasos para migrarem, infiltrando-se assim nas estruturas cerebrais adjacentes ao tumor. Convém ressaltar que os endoteliócitos expressam também metaloproteases que podem ser utilizadas para o favorecimento da invasão tumoral. Além disso, como já citado, as células de glioma utilizam a membrana basal dos vasos como sua principal via de disseminação. Aparentemente essas células são capazes de degradar parte da membrana basal secretada por elas próprias e conservam a membrana basal secretada pelos endoteliócitos que serve como um ponto de ancoramento para o processo migratório.

O VEGF foi fortemente expresso no presente modelo de GBM e foi imunolocalizado tanto no centro quanto nas bordas dos tumores. Interessantemente, a reação de VEGF mostrou-se aumentada no tecido normal adjacente ao tumor quando comparada com o hemisfério contralateral. Esta observação sugere que a indução da angiogênese vai bem além dos limites do tumor, corroborando o potencial maligno do modelo aqui estudado. Vaquero et al. (2002) reportaram um papel dos astrócitos reativos induzidos pelo tumor na produção de VEGF e correlacionaram a sua expressão com a formação de edema peritumoral. De fato, diferentes trabalhos mostraram a relação entre expressões aumentadas de VEGF e a formação de edema em GBMs (YAO et al., 2001). O VEGF pode

agir na permeabilidade vascular *in vivo* (ROBERTS e PALADE, 1995) e no trabalho aqui apresentado foi observada uma expressão de VEGF tanto nas proximidades das células tumorais, quanto dos astrócitos reativos. Assim, ambos os tipos celulares poderiam contribuir para a indução de angiogênese no modelo aqui estudado.

Expressões aumentadas de VEGF também foram detectadas nas áreas próximas à sítios necróticos delimitados pelas conhecidas células em paliçada, como já foi mostrado em diferentes trabalhos na literatura.

A expressão de VEGF na superfície das células endoteliais era esperada e os dados imunohistoquímicos aqui realizados foram confirmados em análises por microscopia eletrônica de transmissão realizadas pelo doutorando Juliano Miyake em nosso laboratório (resultados ainda não publicados). Além disso, a imunomarcagem observada nos sítios tumorais e de astrócitos reativos mostrou-se associada à elementos de matriz extracelular que foram identificados tanto como de natureza fibrilar quanto não fibrilar em. Como revisado por Iozzo e San Antonio (2001), o VEGF pode ser seqüestrado por elementos de MEC como as proteoglicanas heparan sulfato, que agiriam tamponando a sua atividade. Esses autores enfatizaram que as vias de sinalização do VEGF são essencialmente dependentes de heparan sulfato.

Além da observação da expressão de VEGF na matriz que envolve o tumor, a imunomarcagem de VEGF também foi observada na superfície das células tumorais, o que não era esperado. Esse padrão de expressão poderia ser justificado de três maneiras: (1) a sua proximidade à membrana da célula tumoral poderia ser decorrente da sua recente liberação a fim de agir na ativação de endoteliócitos das proximidade, (2) a sua associação com proteoglicanas heparan sulfato pericelulares ou (3) a sua ligação com receptores específicos na superfície da própria célula tumoral.

Esta última hipótese também suporta a idéia de que o VEGF poderia ter um papel no metabolismo dos GBMs. De fato, diferentes trabalhos sugerem que a expressão de VEGF poderia ser vantajosa para o crescimento da célula tumoral de forma similar àquela observada nas células endoteliais (PLATE et al., 1992).

Em tumores cerebrais as expressões dos receptores de VEGF, Flt-1 e Flk-1, são relacionadas com o grau de anaplasia da doença. Como citado nos resultados acima apresentados, a expressão do receptor Flk-1 foi uniformemente imunomarcada no tumor e também nos vasos peritumorais. Por outro lado, a expressão do Flk-1 foi baixa no tecido normal, incluindo os vasos sangüíneos, o que corrobora a observação de outros pesquisadores quanto a não expressão deste receptor em cérebros adultos (YAO et al.,

2001). Nos sítios de cicatriz glial a imunoreação para Flk-1 foi bastante heterogênea em contraste com a reação observada no tumor *per se*. Estes resultados sugerem que os astrócitos reativos induzidos pelo tumor expressam baixas quantidades deste receptor de VEGF. Interessantemente, as imunoreações analisadas em microscopia eletrônica e realizadas pelo colega Juliano Miyake mostraram que não apenas as células endoteliais, mas também as células C6 *in vivo* expressaram o Flk-1 em sua superfície (dados não publicados). Yao et al. (2001) encontraram uma correlação positiva entre as expressões aumentadas de VEGF e Flk-1 e a baixa prognose de pacientes com gliomas (YAO et al., 2001).

O Flt-1, por sua vez, foi imunodetectado tanto na superfície de células tumorais quanto na nos vasos peritumorais, o que sugere que este receptor possa ter um papel no processo angiogênico dos tumores C6 *in vivo*. Análises por hibridização *in situ* realizadas por Plate et al. (1992) mostraram a expressão de Flt-1 apenas nas células endoteliais e não nas células tumorais em espécimes de astrocitomas humanos. No entanto outros trabalhos mostraram a expressão do Flt-1 (RNAm e proteína) por outros tipos de tumores (GRAEVEN et al., 1999; BOOCOOCK et al., 1995; ZHANG et al., 2002). O tecido normal adjacente ao tumor expressou grandes quantidades de Flt-1 e essa expressão pareceu estar relacionada com a cicatriz glial induzida pelos tumores. Nestes sítios observou-se uma imunoreação heterogênea para o Flt-1. A íntima relação entre os capilares do sistema nervoso central e os prolongamentos dos astrócitos (que compartilham a mesma membrana basal), reforça a idéia de que a astroglia, e provavelmente os astrócitos reativos, influenciam no processo neoangiogênico. Além de ser induzida por situações de hipóxia, a secreção de VEGF pelos astrócitos reativos pode também ser induzida por citocinas e fatores de crescimento liberados pelo tumor. Como evidenciado por Krum e Rosenstein (1998), a cicatriz glial induzida pelo tumor C6 expressa VEGF (RNAm e proteína) assim como Flt-1 de uma forma tempo dependente. Nesse trabalho os autores não identificaram a expressão destas proteínas nos vasos peritumorais. Por outro lado, no modelo de glioma de rato aqui estudado foi observada por imunohistoquímicas tanto a expressão de VEGF quanto de Flt-1 nos vasos peritumorais. Essas observações foram também confirmadas por imunocitoquímicas em microscopia eletrônica de transmissão. De fato, diferentes trabalhos mostram que células tumorais de mama e próstata também podem expressar o Flt-1 (PRICE et al., 2001; JACKSON et al., 2002). Nossos resultados mostram que as células C6 *in vivo* expressam o VEGF e os seus receptores (Flk-1 e Flt-1), o que sugere que este tumor poderia usar a via de sinalização induzida por VEGF para favorecer sua própria proliferação.

Embora o papel do Flk-1 na proliferação endotelial e na permeabilidade vascular seja freqüentemente citado, o papel do Flt-1 é pouco conhecido. O Flt-1 pode ser encontrado sob duas formas, como uma proteína transmembrana e também sob a forma solúvel. Essas duas formas de apresentação são na verdade resultado de “splincings” alternativos de seu RNAm (FERRARA et al., 2003). Alguns autores sugeriram que a forma solúvel do Flt-1 poderia ter um papel inibitório na angiogênese via seqüestro do VEGF e controle da sua disponibilidade para os seus receptores específicos (FERRARA, 2004). Além disso, o Flt-1 pode formar heterodímeros com o Flk-1 transmembrânico prevenindo assim a sua autofosforilação e suprimindo a sua sinalização (KENDALL et al., 1996). Dada a alta capacidade angiogênica do modelo de GBM de rato aqui estudado e o possível papel inibitório do Flt-1 na angiogênese, a alta expressão deste receptor no modelo C6 parece paradoxal. No entanto, Lamzus et al. (2003) mostraram que em astrocitomas humanos a expressão de forma solúvel de Flt-1 pode ser correlacionada com a densidade vascular e a sobrevida dos pacientes. Os autores sugeriram que o Flt-1 não necessariamente apresenta um papel inibitório na angiogênese de GBMs por três possíveis razões: (1) a sua ação inibitória está relacionada com o balanço entre as expressões de VEGF versus Flt-1 (nos tumores C6 aqui estudados houve uma fortíssima expressão de VEGF), (2) o Flt-1 solúvel poderia se ligar ao VEGF e protegê-lo da degradação via proteases ou outras enzimas proteolíticas (como já citado, o modelo C6 foi eficiente na produção de metaloprotease tipo 2) e (3) o Flt-1 poderia ser expresso pelas próprias células tumorais e agir como um ponto de regulação da angiogênese.

Uma busca cuidadosa na literatura mostrou que apenas Peoch et al. (2002) analisaram a expressão de VEGF, Flt-1 e Flk-1 no modelo C6 de GBM *in vivo*. Contudo, os autores observaram a expressão dessas moléculas apenas nas células endoteliais. Por outro lado, Steiner et al. (2004) reportaram a expressão de VEGF, Flk-1 e Flt-1 em células de GBMs humanos o que sugere um papel autócrino do VEGF nestas células. Em outro trabalho, os mesmos pesquisadores mostraram *in vitro* que células de GBM que são aptas em expressar o Flt-1 também apresentam uma redução nas suas capacidades migratória e proliferativa após tratamentos com VEGF (HEROLD-MENDE et al., 1999). Avramis et al. (2002) observaram uma redução sinérgica do crescimento tumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro* em um modelo de GBM ortotópico (U87MG) após tratamentos com um inibidor de VEGF específico (quimera Flt-1/fc) e com um inibidor de tirosina quinase (NSC680410). No entanto, Wey et al. (2005) observaram que linhagens de carcinomas pancreáticos capazes de expressar Flt-1 e tratados com VEGF mostraram uma capacidade migratória e invasiva

aumentada apesar da capacidade proliferativa não ter sido alterada. Quando comparado com esses trabalhos os resultados aqui obtidos em relação à expressão de Flt-1 no modelo C6 parecem contraditórios já que esse modelo de GBM apresenta um fenótipo altamente proliferativo e migratório. No entanto, muitos desses estudos foram realizados *in vitro* e não necessariamente refletem as condições *in vivo* observadas no presente trabalho.

Uma expressão aumentada de COX-2 tem sido reportada em diferentes tipos de tumores e correlacionada com um aumento do grau de anaplasia e baixa prognose de GBMs (HARA e OKAYASU, 2004; SHONO et al., 2001). Apenas recentemente foi dada uma maior atenção no papel das cascatas de eicosanóides sobre o metabolismo dos gliomas como foi mostrado na revisão de Nathoo et al. (2004). O presente trabalho analisou a distribuição espacial de COX-2 no modelo de GBM de rato C6. Uma forte imunoreação para a COX-2 foi encontrada tanto nas células tumorais, quanto nas células endoteliais dos vasos peritumorais. Estudos experimentais recentes mostraram que a COX-2 regula a angiogênese induzida por tumores através da produção de certos fatores angiogênicos como o tromboxano A2 (DANIEL et al., 1999). Hara e Okayasu (2004) mostraram uma correlação entre as expressões de VEGF, COX-2 e a densidade microvascular em astrocitomas. No presente trabalho observou-se que a COX-2 foi fortemente expressa em sítios perinecróticos (células em paliçada) e núcleos necróticos como já havia sido descrito por Shono et al. (2001) e Deininger et al. (1999) em gliomas humanos. Interessantemente os padrões de expressão de VEGF e COX-2 no modelo C6 *in vivo* são muito similares. De fato, como mostrado por Schmedtje et al. (1997) para células endoteliais, a COX-2 é induzida por hipóxia e esta indução pode ser mediada pelo NF- κ B p65. Além disso, já está bem estabelecido na literatura que necrose e hipóxia em gliomas levam à regulação positiva do VEGF (MENTLEIN e HELD-FEINDT, 2003).

Além de ter sido expresso em áreas de necrose, a COX-2 também foi imunodetectada em sítios distantes de áreas de hipóxia o que sugere um papel desta enzima não apenas na angiogênese induzida pelo tumor, mas também em outros aspectos do fenótipo maligno. Como revisado por Cao e Prescott (2002) a expressão de COX-2 em tumores sólidos pode agir entre outros sobre o controle do crescimento celular, sobre a adesão e motilidade e mesmo sobre a prevenção da apoptose. Em células epiteliais um aumento da expressão de COX-2 também é associado com expressões aumentadas de bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (TSUJII e DUBOIS, 1995). No entanto, em outro trabalho não foi observada uma correlação entre a expressão de COX-2 e bcl-2 em gliomas humanos analisados por Imunohistoquímica (SHONO et al., 2001). Já Joki et al. (2000) evidenciaram

em gliomas humanos, em dois diferentes modelos *in vitro*, que a inibição seletiva da COX-2 por NS-398 reduziu ambos, o crescimento e migração devido, em parte, à queda na taxa proliferativa das células e a um aumento no número de células apoptóticas. Como sugerido por Cao e Prescott (2002), a superexpressão de COX-2 poderia ainda prevenir a apoptose induzida por ácido araquidônico.

A expressão de COX-2 no modelo de GBM de rato aqui estudado poderia ser explicada ainda pelo seu provável papel na adesão e motilidade celulares. A superexpressão de COX-2 foi previamente associada com um aumento na expressão e ativação de MMP-2 e também com um aumento na expressão de CD44 em células neoplásicas (CAO e PRESCOTT, 2002). Estudos com células CaCo-2 (câncer de cólon) mostraram que o aumento da expressão de COX-2 eleva a expressão de MMP-2 numa via dependente de MT-MMP1 (TSUJII et al., 1997). Células transfectadas com COX-2 além de aderirem melhor à MEC também expressaram menores níveis de E-caderinas (TSUJII e DUBOIS, 1995; SHONO et al., 2001). Em células neoplásicas de pulmão o aumento da expressão de COX-2 levou a um aumento na expressão de CD44 e na capacidade invasiva das células (DOHADWALA et al., 2001). Neste contexto, foi sugerido que fragmentos de HA são capazes de regular a expressão de COX-2 numa via dependente de CD44. Até onde esta via seria válida também para o modelo C6 não é conhecido, já que em C6 observou-se uma baixa imunomarcação para o CD44. Por outro lado, o modelo aqui estudado expressou consistentemente a MMP-2, que poderia ser regulada pela COX-2 tumoral.

Ao menos nos estágios iniciais, a angiogênese e a invasão tumoral compartilham as mesmas características de degradação controlada da MEC a fim de permitir a migração celular e a formação do novo tecido. Neste aspecto as metaloproteases desempenham um papel importante nesse processo. Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 são descritas como superexpressas em GBMs (BINDER e BERGER, 2002). No modelo de GBM aqui estudado a MMP-2 foi expressa em sítios que condizem com a MEC tumoral (formada por componentes fibrilares e não-fibrilares) e na superfície das células C6 e endoteliais. Ambas as células são responsáveis pela remodelação da MEC circundante durante o processo neoangiogênico. A imunodeteção de MMP-2 na superfície das células endoteliais e tumorais foi ainda confirmada em nosso laboratório por microscopia eletrônica de transmissão e é consistente com a conhecida via de ativação da MMP-2 que, em seu estágio inicial, é dependente da ligação indireta à membrana plasmática via MT1-MMP, TIMP-2 e a integrina $\alpha_v\beta_3$ (DERYUGINA et al., 1997). Um dado interessante observado no

presente trabalho foi que o modelo C6 não expressa MMP-9 *in vivo*, como foi observado nas análises imunohistoquímicas.

A observação da associação entre as células de glioma C6 e os vasos peritumorais pôde ser observada nas imunomarcações para diferentes moléculas analisadas e reafirma o papel dos vasos sanguíneos como um substrato físico para a migração das células de glioma. Assim como foi observado para o VEGF nas células C6 migrando por vasos também identificou-se uma superexpressão de MMP-2, o que sugere um papel central desta enzima proteolítica nesse padrão de migração no presente modelo *in vivo*. Por outro lado, a MMP-9 parece não apresentar um papel na migração associada a vasos no modelo C6.

Conjuntamente os resultados aqui apresentados poderiam suportar a hipótese de um papel do VEGF e seus receptores na migração do modelo C6. Essas proteínas são prováveis alvos terapêuticos e, caso inibidas, poderiam reduzir a reincidência da doença resultante das células infiltrativas que migram ativamente por vasos peritumorais.

A **figura 21** mostra um resumo de todos os prováveis processos aqui citados e envolvidos com a migração e invasão das células C6 infiltrativas.

TABELA 6 – RESUMO DAS REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS

	Centro do tumor	Bordas do tumor	Áreas proliferativas	Vasos peritumorais e tumorais	Vasos normais	Cicatriz glial	Células em paliçada	Áreas de necrose	Tecido normal ao redor do tumor	Tecido normal do hemisfério contralateral	Expressão em células associadas a vasos peritumorais
VEGF	++	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	+-	+++
Flt-1	+++	+++	++	+++	++	+-	no	no	+++	+	+++
Flk-1	++	++	+	++	+	+-	no	no	-	-	++
COX-2	++	+++	++	++	-	-	+++	+++	+	-	-
MMP-2	+++	+++	++	++	-	-	+++	++	-	-	+++
MMP-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GFAP	-	+-	-	++	+-	+++	-	-	+++	+-	-
B-FABP	+++	+++	++	-	-	+	+++	++	++	++	-
TN-C	+	++	+	++	-	-	-	+	-	-	+++
TN-R	-	-	-	-	-	(+++)*	-	-	+++	(+)**	-
FN	++	+++	-	++	-	-	+	+	-	-	+++
VN-65	+++	+++	+	+++	+++	-	no	+++	+- (vasos)	+- (vasos)	+++
CD44	+	+	-	-	-	+	+-	+-	-	-	-
RHAMM	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	++	?	+++
Integrina β_1	++	+++	+	++	++	+	no	no	+	++ (vasos)	+++
Integrina α_v	+++	+++	+	++	-	+	no	no	+	-	+++
Colágeno I	+++	+++	+	++	++	+	no	no	+	++ (vasos)	+++
Colágeno III	++	++	+	-	-	-	no	no	-	-	+
Colágeno IV	++	++	+	++	++	-	no	no	+	++	+
Brevican	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Versican	++	++	-	-	-	+	++	++	+	-	+++
Agrecan	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

(+++) fortemente marcado, (++) moderadamente marcado, (+) fracamente marcado, (+-) marcação heterogênea, (-) marcação ausente e (no) não observado.

Moléculas envolvidas com a angiogênese (laranja), Moléculas envolvidas com a diferenciação (verde), glicoproteínas adesivas (amarelo), moléculas de adesão (azul), colágenos (roxo), proteoglicanas (cinza).

* a marcação variou muito entre os tumores

** na rede perineuronal de neurônios corticais

Figura 21: Resumo de alguns processos envolvidos com a migração, invasão e angiogênese de uma hipotética célula C6 infiltrativa.

A imagem aqui apresentada mostra uma célula C6 infiltrativa e migrando pelos vasos peritumorais. O **Estágio 1** da imagem mostra alguns dos elementos de MEC disponíveis a esta célula. À direita acima estão representados diversos proteoglicanos (agrecan, versican e brevican) ligados ao HA que é abundante no cérebro de ratos. Todos esses proteoglicanos foram expressos pelo tumor C6. Contudo, o versican apresentou uma expressão mais acentuada. A TN-R (aqui apresentada como TN) apresenta a habilidade de ligar-se às glicosaminoglicanas dos diferentes proteoglicanos expressos e pode intermediar a ligação com outros proteoglicanos formando uma rede pericelular de elementos de matriz. A forte expressão de TN-R nos sítios de cicatrização glial coincide com as áreas infiltrativas do tumor. A expressão de brevican GPI ligado poderia ancorar outros proteoglicanos (como o versican), via TN-R, à superfície da célula (esquerda abaixo). As células C6 infiltrativas foram aptas a expressar a FN e a TN-C (centro da imagem). Esta última pode ligar-se a integrinas específicas compostas pela subunidade $\beta 1$. Esta subunidade também foi fortemente expressa nas células migrantes. A ligação TN-C x integrinas com a subunidade $\beta 1$ levaria à ativação das cascatas de sinais das integrinas que podem induzir a proliferação e a migração. A FN também pode se ligar à sua integrina específica a $\alpha \nu \beta 1$, que foi expressa no modelo aqui estudado. Essa ligação levaria à ativação da quinase de adesão focal (FAK), induzindo a atividade migratória e proliferativa da célula. Além disso, a FN possui sítios de ligação com colágenos o que poderia justificar a forte expressão pericelular do colágeno tipo I nas células infiltrativas. A própria ligação dos colágenos às suas integrinas específicas (que contém a subunidade $\beta 1$) pode induzir o fenótipo migratório. As células C6 também foram aptas em expressar a VN abundantemente (à esquerda da imagem). A migração da célula usando o vaso peritumoral pode ser uma vantagem para a célula infiltrativa. Isto porquê os próprios vasos apresentam elementos de matriz permissíveis à migração. A membrana basal dos vasos peritumorais se mostrou particularmente rica em colágenos tipo IV e tipo I, FN e VN. Essa membrana basal é depositada tanto pelos próprios endoteliócitos quanto pelos astrócitos reativos, que induzem a angiogênese ao redor do tumor via VEGF. A célula tumoral, por sua vez, pode remodelar essa MEC. O **Estágio 2** da imagem mostra algumas interações propostas no presente trabalho. À direita é representada a ligação de RHAMM com o HA, que por sua vez ancora diferentes proteoglicanas. A baixa imunomarcagem de CD44 sugeriu que este receptor não seria tão importante na ligação com o HA. O RHAMM pode ativar cascatas de sinais e induzir a proliferação, pode ainda ser internalizado e interagir com o fuso mitótico da célula. Como citado na introdução, o versican pode se ligar à superfície da célula via subunidade $\beta 1$ das integrinas. A própria expressão de versican pode induzir a expressão de $\beta 1$. Além disso, o versican pode ligar-se à FN, que por sua vez apresenta um sítio de ligação para o VEGF. A ligação versican x $\beta 1$ seria uma outra forma de justificar a expressão pericelular dessa proteoglicana, que pode ainda, via TN-R ligar-se a outras proteoglicanas indutoras de migração como o brevican. A formação do complexo versican/FN/VEGF poderia ser uma forma de proteger o VEGF da degradação proteolítica via, por exemplo, MMP-2. Interessantemente (como citado na discussão) o versican pode, por uma via não conhecida, induzir a expressão do VEGF. O VEGF é reconhecido pelos seus receptores (Flt-1 e Flk-1) que são expressos pela própria célula tumoral. Assim, não apenas os endoteliócitos expressam esses receptores para a indução de sua proliferação, como a própria célula tumoral o faz. A expressão de Flt-1 ao redor do tumor sugere que este pode ser expresso tanto pelos astrócitos reativos, quanto pelas células tumorais na sua forma solúvel. Este receptor solúvel poderia funcionar como um seqüestrador de VEGF, protegendo este fator de crescimento da degradação proteolítica. O **Estágio 3** da imagem mostra alguns processos envolvidos com a degradação proteolítica nas células C6 infiltrativas. A MMP-2 foi eficientemente expressa pela célula e sua ativação é dependente das expressões de TIMP-2, MT1-MMP e da integrina $\alpha \nu \beta 3$ (à direita da imagem). A MMP-2, além de remodelar a MEC circundante poderia ter um papel na liberação de sítios bioativos da MEC. Um exemplo seriam os domínios EGF das moléculas de TN (R e C) que são expressas no tumor C6 *in vivo* ou ao redor dele. A liberação de EGF poderia induzir a proliferação nessas células. A própria VN (à esquerda da imagem) pode se ligar à sua integrina específica (que contém a subunidade $\alpha \nu$) e induzir a migração via FAK ou até mesmo a expressão de MMP-2. Esse MMP-2 pode agir degradando a MEC circundante e a membrana basal para induzir a migração. Além disso, a expressão de COX-2 poderia induzir também a expressão de MMP-2. O papel da COX-2 na indução da expressão de CD44 pode ter um menor papel nessas células.

Prancha 1 - Características histológicas de GBMs humanos (cortes em parafina – 5 µm, corados com hematoxilina e eosina). (A e B) Áreas de alta celularidade. (C e D) Presença de vasos com paredes espessadas. Observe em C que o vaso está rodeado por células tumorais. (E) Núcleos com atipias (seta). (F) Área de necrose. (G e H) Presença de células gigantes multinucleadas.

Prancha 2 - Aspectos morfológicos do modelo C6 de GBM (Criocortes de 20µm corados com hematoxilina e eosina). (A) Principais regiões identificadas no tumor (a) foco necrótico, (b) células em paliçada, (c) região de alta taxa mitótica e marcada pela alta celularidade, (d) região com alta angiogênese, (e) bordas infiltrativas do tumor e (f) tecido cerebral normal. **(B)** Detalhe da borda do tumor. Observe a alta capacidade angiogênica de C6 e a presença de vasos peritumorais (setas). Note ainda as bordas difusas do tumor, o que impossibilita a diferenciação do tecido normal versus tecido tumoral.

Prancha 3 - Aspectos morfológicos do modelo C6 de GBM (Cortes em parafina de 5µm corados com hematoxilina e eosina). (A) Note que as bordas difusas do tumor estão muitas vezes associadas com as regiões de maior angiogênese do tumor e que muitos vasos irrigam esse tumor (setas fechadas). **(B)** Tumor observado em menor magnitude com uma extensa região de necrose (entre setas abertas).

Prancha 4 - Aspectos morfológicos do modelo C6 de GBM (Cortes em parafina de 5μm corados com hematoxilina e eosina). (A) Vaso neoformado cortado longitudinalmente (seta) no limite entre o tumor e o tecido cerebral normal. Note que apesar dos animais terem sido perfundidos ainda pôde-se encontrar hemácias nos vasos tumorais. **(B)** Vaso neoformado cortado longitudinalmente (seta). Note algumas células tumorais justapostas no final do vaso onde se observam também hemácias. **(C)** Glioma C6 não processado (criocorte de 20 μm apenas hidratado e montado, núcleos contracorados com metil-verde). Note a presença de cor nas células de glioma. O cromógeno aqui apresentado não pôde ser identificado.

Prancha 5 - Cortes coronais de cérebros de rato com tumor C6 implantado corados com hematoxilina-eosina. (a)→(j) criocortes de 20 µm de animais com tumores de 20 dias. Observe em (a)→(h) que os tumores apresentam uma preferência em migrar pelo corpo caloso. Em (i) observa-se um tumor com alto crescimento e celularidade e em (j) um tumor com uma extensa área de necrose. (k)→(m) cortes em parafina de animais com tumores de 21 dias. Observe em (l) que o tumor foi capaz de migrar para um sítio muito distante do sítio de injeção (seta). Em (m) pode-se observar nitidamente o sítio de injeção. (n) e (o) cortes em parafina de 5 µm de animais com tumores de 28 dias. Observe que mesmo em cortes histologicamente distantes da região de injeção ainda foi possível encontrar-se o tumor C6.

Prancha 6 - Imunohistoquímica para GFAP no tumor C6 usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20μm). (A) Controle negativo. **(B)** Imunodeteção de GFAP no tecido cerebral normal. **(C, D, E e F)** Imunodeteção de GFAP no limite do tecido tumoral x tecido normal. Observe que as células C6 não expressam GFAP (setas fechadas) e que há uma expressão elevada deste nas bordas do tumor (setas abertas) na região da cicatriz glial. Observe ainda a superexpressão de GFAP na cicatriz glial quando comparado ao tecido normal (B). **(G e H)** Processos astrocíticos dos astrócitos reativos da região da cicatriz glial (setas).

Prancha 7 - Imunohistoquímica para GFAP no tumor C6 usando HRP-DAB, intensificação com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). (A) Controle negativo e detalhes em maior aumento do tumor indicando a transição Tumor (Tu) / Cicatriz Glial (CG) / Tecido Normal (TN) e o centro do tumor (CTu). **(B)** Imunodeteção de GFAP. Observe a forte reação envolvendo o tumor. As células C6, por sua vez, não apresentaram uma expressão significativa de GFAP. As análises de diferentes montagens mostraram que a cicatriz glial foi induzida pela presença do tumor e não apenas pelo estresse mecânico decorrente do processo de injeção das células C6.

Prancha 8 - Imunohistoquímica para B-FABP no tumor C6 usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). (A) Controle negativo. (B e C) Tumores C6 (Tu) na interface com o tecido normal (TN). Observe que o tumor é capaz de expressar B-FABP e diversas células apresentam uma marcação mais intensa (setas). (D) A análise do centro do tumor em maior magnitude mostra uma expressão heterogênea pelas células C6.

Prancha 9 - Imunohistoquímicas para GFAP e B-FABP em células C6 em cultivo usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde. (A e B) Controles negativos. (C e D) Imunomarcção para GFAP. (E e F) Imunomarcção para B-FABP.

Prancha 10 - Imunohistoquímicas para GFAP e B-FABP em GBM humano usando digestão com tripsina, HRP-DAB, intensificação com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (cortes em parafina de 5 μ m). (A) Controle negativo do GFAP. (B, C e D) Imunomarcção para GFAP. Observe a expressão de GFAP no tumor o que conota a sua natureza astrocítica. No entanto, a expressão por apenas algumas células evidencia a desdiferenciação do tumor. (E) Controles negativos do B-FABP. (F, G e H) Imunomarcações para B-FABP.

Prancha 11 - Imunohistoquímicas para TN-C e TN-R no tumor C6 usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). (A) Controle negativo das reações. (B e C) Imunoreação para TN-C no tumor C6. Observe a natureza da marcação formando anéis ao redor das células. (D) Áreas infiltrativas do tumor C6. Observe que a TN-C é expressa principalmente pelas células das margens do tumor. (E) Imunodeteção de TN-C em um vaso adjacente ao tumor. Observe células positivamente marcadas no espaço perivascular. (F) Áreas centrais e bordas infiltrativas do tumor C6 marcadas para TN-C. Observe que a expressão desta glicoproteína é bem heterogênea no tumor como um todo. (G e H) Tumores imunomarcados para TN-C e intensificados com ósmio. Observe em G a expressão de TN-C permeando a MEC tumoral (setas).

Em H nota-se que os núcleos estão indistintos devido à forte intensificação da reação. (I e J) Marcação de TN-R em dois diferentes tumores. Observe que o tumor *per se* (Tu) não expressa TN-R, contudo esta glicoproteína pôde ser encontrada circundando o tumor na região da cicatriz glial (CG). O tecido cerebral normal (TN) apresenta uma expressão basal e uniforme de TN-R. A imagem J corresponde à interface tumor versus tecido normal. Observe a ativa angiogênese na região da cicatriz glial (setas) e a marcação uniforme de TN-R. (K) O centro do tumor C6 não apresentou expressão de TN-R. (L e M) Controles positivos para TN-R. Observe a marcação envolvendo os corpos celulares e dendritos proximais de diferentes neurônios corticais. Observe em L uma forte marcação de TN-R na provável rede perineuronal.

Prancha 12 – (Imagem A) Foto-montagens de imunohistoquímicas para a TN-R no tumor C6 usando HRP-DAB, intensificação com ósmio e núcleos contra-corados com metil-verde (criocortes de 20 μ m). Observe a intensa expressão de TN-R nas áreas correspondentes às cicatrizes gliais induzidas pelos tumores. Contudo, essa imunomarcacão não foi uniforme entre os animais, sendo observados tumores tanto com reações muito

intensas de TN-R (tumor 1), quanto imunoreações moderadas (tumores 2 e 4) e fracas (tumor 3). As células nos centros tumorais não apresentaram imunomarcacão (células com falsa imunomarcacão podem ser observadas nos 4 animais acima e correspondem a células C6 pigmentadas -vide resultados e discussão). (Imagem B) – Imunomarcacão de TN-R em um GBM humano usando HRP-DAB, intensificação com ósmio e núcleos contra-corados com metil-verde (cortes em parafina – 5 μ m). A TN-R foi muito pouco expressa no tumor analisado e encontrada em poucas células isoladas (detalhe).

Prancha 13 - Imunohistoquímicas para TN-C e TN-R em células C6 em cultivo usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde. (A e B) Controles negativos das reações. (C e D) Imunomarcações para TN-R. (E e F) Imunomarcações para TN-C.

Prancha 14 - Imunomarcção para a FN em C6 *in vivo* (criocortes de 20 µm) e *in vitro* usando HRP-DAB, intensificação com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde). A imunomarcção da FN foi intensa em todos os tumores observados. O tumor aqui apresentado apresenta um aspecto mais frouxo, decorrente das diversas áreas de necrose nele presentes **(A)**. A expressão de FN foi aumentada nas bordas do tumor e apresentou ambos aspectos morfológicos: um filamental e permeando a matriz extracelular que envolvia as células C6 (setas fechadas) e outro associado à superfície das células tumorais (setas abertas).

(B) Foram observadas células com uma forte marcação em seus núcleos. Áreas proliferativas (asteriscos) não apresentaram a imunomarcção para a FN em nenhum dos tumores analisados. Células marcadas e associadas a vasos peritumorais foram observadas, mas nunca em sítios muito distantes do tumor. *In vitro* as células C6 expressaram abundantemente a FN como pode ser observado no detalhe acima. Sua marcação foi caracteristicamente filamental e uniforme. A imunomarcção com PCNA *in vitro* evidenciou ainda várias células em divisão (detalhe) sugerindo que *in vivo* as células proliferativas apresentam um papel diferente de *in vivo*, onde há uma regulação negativa da expressão de FN.

Prancha 15 – Imunohistoquímicas para a VN em C6 *in vivo* e *in vitro* usando digestão com tripsina, HRP-DAB, intensificação com ósmio e contra-coloração com metil-verde. A prancha mostra a expressão de VN em três diferentes modelos experimentais. O modelo de GBM C6 expressou a VN fortemente em todos os tumores analisados. Uma expressão aumentada foi observada nas bordas do tumor com o tecido normal nas áreas correspondentes ao fronte de migração. O sentido da migração/invasão dos tumores aqui apresentados pôde ser determinado pelas análises dos cortes seriados dos tumores. O **tumor 1** exemplifica um tumor que cruzou o corpo caloso do animal. Observe o nítido aumento de expressão de VN no limite direito do tumor onde se encontra o seu fronte migratório. As setas fechadas indicam células de glioma fortemente marcadas para a VN e foi possível observar ainda a expressão de VN ao redor de células isoladas migrando pelo corpo caloso do animal. As áreas proliferativas (asteriscos) do tumor não apresentaram uma expressão significativa de VN. Observou-se ainda que a região da predita cicatriz glial expressou VN fracamente quando comparado ao tumor. Vasos peritumorais também foram aptos a expressar essa glicoproteína (setas abertas). Os tumores 2 e 3 evidenciam uma forte imunomarcagem nas suas bordas infiltrativas. Os sentidos da migração/ invasão dos tumores estão indicados nas montagens. O **tumor 2**, apesar de diminuto apresentou várias características de marcação observadas em outros tumores analisados. No detalhe à esquerda do tumor 2 observa-se que a imunomarcagem de VN apresenta-se ao redor das células tumorais (setas fechadas), mas com uma característica “fibrilar” (setas abertas), formando uma rede ao redor dessas células. O detalhe à direita mostra células fortemente imunomarcadas (setas fechadas) em um sítio muito próximo de um vaso peritumoral. Essas últimas são menores e o tamanho da célula praticamente equivale ao tamanho de seus núcleos (corados em azul esverdeado com metil-verde). Tanto a região da cicatriz glial, quanto a região proliferativa deste tumor (asterisco) não expressaram a VN. O **tumor 3** também apresentou suas bordas fortemente marcadas para a VN (setas abertas), contudo a região da cicatriz glial que envolve o tumor não expressou VN (setas fechadas). Nos detalhes menores pode-se comparar duas regiões muito diversas do tumor: um sítio de proliferação (indicado por asteriscos) onde a expressão da VN foi muito baixa e um sítio de alta imunoreatividade para a VN e correspondente à uma borda infiltrativa do tumor. Os detalhes maiores mostram células tumorais associadas a vasos peritumorais.

A prancha mostra ainda imagens da imunomarcagem de VN em células C6 em cultivo. Para essas reações não foi necessária a digestão com tripsina e intensificação com ósmio. *In vitro* a VN foi fracamente imunomarcada.

Prancha 16 - Controle negativo da imunohistoquímica para VN no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 µm). (A) Foto montagem do tumor. Esse tumor se infiltrou exclusivamente pelo corpo caloso do animal. Observe ainda a intensa expressão de cromógeno pelas células tumorais. **(B)** Massa tumoral com a presença de células “coloridas”. **(C)** Região infiltrativa do tumor. **(D)** Pólo proliferativo cercado de células que expressaram cromógeno.

Prancha 17 - Imunohistoquímicas para VN no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μm). (A) Foto montagem do tumor. **(B)** Região infiltrativa do tumor evidenciando alta angiogênese com a presença de muitos vasos peritumorais (*). **(C)** Região infiltrativa do tumor fortemente marcada para vitronectina. Observe a deposição de vitronectina na MEC e a forte marcação dos vasos adjacentes ao tumor (setas). **(D)** Núcleo proliferativo do tumor com pouca marcação (*). Observe que as células que expressaram cromógeno também expressaram fortemente a vitronectina.

Prancha 18 - Imunohistoquímicas para VN e FN em GBM's humanos usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (cortes em parafina – 5µm). (A) Controle negativo das reações. (B a E) Imunomarcção para vitronectina. Observe a deposição fibrilar da vitronectina na MEC. (F) Imunomarcção de vitronectina em áreas de necrose. (G e H) Imunomarcção de fibronectina.

Prancha 19 - Imunohistoquímicas para os Colágenos I, III e IV no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). (A e E) Controles negativos das reações. (B e F) Imunomarcações para colágeno I. (C e G) Imunomarcações para colágeno III. (D e H) Imunomarcações para colágeno IV.

Prancha 20 - Imunohistoquímicas para os Colágenos I, III e IV no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). (A e E) Controles negativos das reações. (B e F) Imunomarcações para colágeno I. Observe a presença de células fortemente marcadas, mesmo em sítios distantes do tumor. (C e G) Imunomarcações para colágeno III. (D e H) Imunomarcações para colágeno IV.

Prancha 21 - Imunohistoquímicas para Colágeno I no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μm). (A) Padrão da imunomarcação de colágeno I. Observe a fina rede com áreas de marcação puntiforme envolvendo as células. (B) Marcação do colágeno no tumor e a presença de algumas células mais fortemente marcadas.

Prancha 22 - Imunohistoquímicas para VN, Colágeno IV e Colágeno I no tecido normal usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 mm). (A) Controle negativo das reações. **(B)** Imunomarcacão para VN. Observe a presença dessa glicoproteína nas membranas basais dos vasos (setas). **(C a G)** Imunomarcacões para colágeno IV nas membranas basais dos vasos do tecido normal. Note a imunomarcacão tanto nos vasos de maior calibre, quanto nos de menor calibre. **(H)** Imunomarcacão para colágeno I nas membranas basais dos vasos.

Prancha 23 - Imunohistoquímicas para Colágeno I em GBMs humanos usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (cortes em parafina – 5µm). (A) Controle negativo do GBM1. (B) Controle negativo do GBM2. (C, E, F) Imunomarcações para colágeno I no GBM1. (D) Imunomarcações para colágeno I no GBM2.

Prancha 24: Imunohistoquímicas para os Colágenos I, III e IV em células C6 em cultivo usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde. A - Controle negativo dos Colágenos I e III. B - Controle negativo do Colágeno IV. C - Imunomarcacão para colágeno I. D - Imunomarcacão para colágeno IV. E - Imunomarcacão para colágeno III. Mesmo após dois dias de cultivo não observou-se a deposição de nenhum dos colágenos analisados *in vitro*.

Tumor 1

Tumor 3

Imagem A

Versican

Controle Negativo

Direção da migração/invasão

Tumor 2

Imagem B

Prancha 25 – Imunomarcações para as proteoglicanas Versican, Brevican e Agrecan no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μ m). A imagem A mostra a expressão de versican em três diferentes modelos experimentais. O tumor 1 apresenta-se mais frouxo e com várias áreas de morte celular/necrose. No detalhe maior pode-se observar a expressão dessa proteoglicana tanto associada à superfície das células tumorais que permeiam as regiões necróticas do tumor, quanto no espaço condizente com a matriz extracelular do tumor. Contudo, no centro proliferativo do mesmo (asteriscos) não há a expressão de versican. Nos detalhes menores pode-se notar uma expressão aumentada do versican em células associadas a vasos peritumorais, tanto em um sítio muito próximo ao tumor como em um sítio mais distante. Os tumores 2 e 3 apresentaram-se mais compactos e sólidos e ambos puderam ter suas direções de migração/invasão identificadas pela análise dos cortes seriados. O Tumor 2 apresenta a expressão de versican por todo o tumor, principalmente nas bordas infiltrativas do mesmo. Comparado com outras áreas do tumor, o centro proliferativo (asterisco) não apresentou uma expressão significativa de versican. A análise da borda infiltrativa do tumor evidenciou ainda uma expressão do versican principalmente associada ou próxima à superfície das células C6 (detalhe – setas abertas). Esta mesma natureza de marcação não foi observada no centro do tumor que apresentou a expressão do versican mais restrita ao espaço extracelular que permeia as células tumorais. Na borda oposta do tumor a expressão de versican próxima à superfície celular também pôde ser observada e muitas dessas células apresentaram também uma associação com vasos peritumorais. O detalhe do tumor 3 mostra uma região com nítida expressão do versican permeando o compartimento extracelular entre as células tumorais. Por outro lado, nas bordas esquerda e superior do tumor 3 observa-se células C6 marcadas em suas superfícies para o versican. A imagem B mostra a imunomarcação comparada de brevican e agrecan em dois diferentes modelos experimentais. Ambas proteoglicanas foram uniformemente expressas pelos tumores analisados e distribuíram-se principalmente na matriz extracelular. Nenhuma dessas moléculas apresentou-se mais ou menos expressas nas superfícies das células C6 nos diferentes setores tumorais. Observação: As escalas da imagem B são todas iguais.

Prancha 26: Imunohistoquímicas para Agrecan, Brevican e Versican em células C6 em cultivo usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde. **A** - Controle negativo das reações. **B** – Imunomarcacão para Agrecan. **C** - Imunomarcacão para Brevican. **D** - Imunomarcacão para Versican.

Prancha 27 - Imunomarcações comparadas dos receptores de ácido hialurônico (RHAMM e CD44) no modelo C6 *in vivo* e *in vitro* usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μm): As imagens aqui compostas são provenientes de um mesmo indivíduo experimental. O RHAMM foi fortemente imunomarcado no tumor incluindo as áreas de necrose e sítios de intensa proliferação. Contudo, células mais fortemente marcadas foram observadas associadas a vasos peritumorais e no limite entre o tecido tumoral e normal (detalhes). Observou-se ainda células intensamente marcadas no tecido normal adjacente às bordas do tumor, o que condiz com células C6 infiltrativas (setas). O tecido astrogliótico também pareceu expressar o RHAMM. *In vitro* o RHAMM foi uniformemente expresso pelas células C6 sendo que nas células em divisão foi co-localizado com o fuso mitótico como observado por outros pesquisadores. Não foi observado em C6 *in vivo* uma expressão significativa de CD44. Ao contrário do RHAMM, o CD44 não foi significativamente imunomarcado em todos os sítios do tumor, como áreas de necrose, bordas infiltrativas e vasos peritumorais. No entanto, foi possível observar algumas células isoladas marcadas mais intensamente para esse receptor, principalmente nas proximidades dos limites tumorais. *In vitro* o CD44 também foi fracamente expresso. Aliados, os resultados das imunomarcações de RHAMM e CD44 evidenciam um comportamento semelhante entre as células cultivadas (*in vitro*) e as implantadas (*in vivo*).

Prancha 28 - Imunohistoquímicas para CD44 em diferentes tecidos usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). A coluna da esquerda (**A, C, E, G**) representa os controles negativos das reações para, respectivamente, cortes de esterno, de baço, de linfonodo e de pele de rato. A coluna da direita (**B, D, F, H**) representa as imunomarcações de CD44 nestes mesmos tecidos. Observe a forte expressão de CD44 em todos os tecidos analisados.

Prancha 29 - Imunohistoquímicas para CD44 em GBM humano usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (cortes em parafina – 5μm). (A e B) Controles negativos. (C e D) Imunomarcações para CD44. Observe a forte expressão de CD44 no tumor e a marcação característica formando halos ao redor das células.

Prancha 30 - Imunohistoquímicas para a subunidade β_1 das integrinas no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μ m). (A, C, E e G) Controles negativos das reações. (B, D, F e H) - Imunomarcações para a subunidade β_1

Prancha 31 - Imunohistoquímicas para a subunidade β_1 das integrinas no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). (A) Foto montagem do tumor 1. Controle negativo da reação. **(B)** Detalhe da borda do tumor do controle negativo. **(C)** Imunomarcacão para a subunidade β_1 . Detalhe da borda do tumor imunomarcada. Observe que essa subunidade de integrina foi expressa no tumor homogeneamente. **(D)** Foto montagem do tumor 1. Imunomarcacão para subunidade β_1 .

Prancha 32 - Imunohistoquímicas para a subunidade β_1 das integrinas no tecido cerebral normal usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μm). (A, C, E e G) Controles negativos das reações. (B) Imunomarcção da subunidade β_1 na pia máter. (D) Imunomarcção da subunidade β_1 nos vasos do tecido normal. (F e H) Imunomarcações da subunidade β_1 no plexo coróide.

Prancha 33 - Imunomarcações para a subunidade alfa v das integrinas no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μm): A subunidade alfa v das integrinas foi abundantemente expressa pelo tumor como um todo. Uma expressão aumentada foi observada nas bordas do tumor, coincidindo geograficamente com a expressão de outras moléculas como vitronectina e fibronectina que são seus ligantes. Uma expressão muito aumentada foi observada também em células isoladas em sítios distantes do tumor. A análise mais acurada mostrou que muitas destas células apresentavam-se associadas a vasos peritumorais e/ou tumorais (detalhes B, C, D e E). Células C6 associadas a vasos apresentaram características de células em franca migração como p.e expansões citoplasmáticas (C). Foram observadas ainda células migrantes, intensamente marcadas não associadas a vasos (imagem A, seta aberta) mostrando que o modelo C6 também é capaz de migrar por outros elementos de matriz que não a lamina basal dos vasos. As setas fechadas mostram algumas células intensamente marcadas migrando pelo corpo caloso do cérebro. O tumor aqui apresentado apesar de não ter desenvolvido uma massa tumoral significativa, mostrou-se altamente invasivo (como se observa pelas células infiltrantes fortemente marcadas ao redor do neoplasma). Esse fato sugere ainda que o efeito de massa nesse modelo não necessariamente é o responsável pelo aumento de sua capacidade invasiva, dado que não foi observada uma relação entre o tamanho do tumor e o número de células “infiltrantes” marcadas para a subunidade alfa v das integrinas entre os animais experimentais.

Prancha 34 - Imunohistoquímicas para as subunidades α_v e β_1 das integrinas no tumor C6 usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μm). Ambas marcações foram realizadas no mesmo animal experimental. **(A)** Controle negativo das reações. **(B)** Imunomarcacão da subunidade α_v das integrinas. Observe as células infiltrativas fortemente marcadas em sítios distantes do tumor e muitas vezes associadas a vasos. As áreas proliferativas apresentaram uma baixa expressão desta subunidade de integrinas (asteriscos). **(C)** Imunomarcacão da subunidade β_1 . Observe uma expressão mais uniforme desta subunidade que, ao contrário da subunidade α_v , não foi expressa fora do tumor.

Prancha 35 - Imunohistoquímicas para VEGF e COX-2 no tumor C6 usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20µm). (A e B) Controles negativos. **(C)** Imunomarcção de VEGF em menor aumento. Observe a marcação na região das células em paliçada (*) e na região de alta neoangiogênese do tumor (setas). **(D)** Limite do tecido não tumoral / Borda do tumor. Esta é uma região de alta neoangiogênese e onde estão os sítios infiltrativos do tumor. Observe a intensa expressão de VEGF tanto nos vasos tumorais, quanto nos vasos do tecido normal (setas). **(E)** Tecido normal (provável cicatriz glial) adjacente ao tumor. Observe a intensa e extensa expressão de VEGF tanto nos vasos, quanto permeado entre as células (MEC) no tecido normal adjacente ao tumor. **(F)** Expressão de COX-2 próximo ao centro do tumor. **(G)** Imunomarcção de COX-2 em menor aumento. Observe a imunomarcção mais intensa nas áreas das células em paliçada (seta) que circundam uma extensa área necrótica e na borda do tumor, sítio de alta angiogênese. **(H)** Em maior aumento observe a expressão de COX-2 na proximidade dos vasos neoformados e em células de glioma presentes em áreas de intensa proliferação na borda do tumor (setas). A expressão no tecido normal não foi observada.

Prancha 36 - Imunohistoquímicas para COX-2 em GBM humano usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (cortes em parafina – 5 μm). (A e B) Controles negativos. (C, D e E) Imunomarcações para COX-2. Observe que esta enzima foi mais fortemente expressa em algumas ilhas de células isoladas do tumor e apresentou um padrão de imunoreação citoplasmático característico.

Prancha 37 – Imunohistoquímicas comparadas para VEGF, MMP-2, Flt-1 e Flk-1 no tumor C6 usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 µm): As foto-montagens mostram as imunomarcações realizadas no mesmo animal experimental. **(A)** Controle negativo. **(B)** Imunohistoquímica para VEGF. Observe a forte imunomarkação em áreas de necrose do tumor. O VEGF foi fortemente expresso na cicatriz glial e no tecido normal que circunda o tumor (detalhe). **(C)** Imunohistoquímica para MMP-2. O tumor expressou essa enzima proteolítica sendo nítido um aumento de expressão pelas células C6 migrando pelos vasos (detalhe). **(D)** Imunohistoquímica para o receptor de VEGF Flt-1. A expressão de Flt-1 foi observada tanto no tumor quanto no tecido normal que o circunda. O padrão de expressão entre o VEGF e o Flt-1 (detalhes das imagens B e D) foram distintos já que observou-se a expressão deste receptor não apenas nos vasos peritumorais, mas também difuso na MEC. As setas indicam uma expressão aumentada de Flt-1 nas células migrando por vasos peritumorais. **(E)** Imunohistoquímica para o receptor de VEGF Flk-1. Observe que as células que foram aptas em expressar Flt-1 foram encontradas nos mesmos sítios tumorais onde observou-se a expressão de Flk-1. T=Tumor, CG=Cicatriz Glial, TN=Tecido Normal

Prancha 38 – Imunohistoquímicas comparadas para MMP-2, Flt-1 e Flk-1 no tumor C6 usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 µm): As foto-montagens mostram as imunomarcações realizadas no mesmo animal experimental. **(A)** Controle negativo. As ampliações à esquerda mostram a transição entre o tumor (T) /cicatriz glial (CG)/ tecido normal (TN) e à direita o centro do tumor. **(B)** Imunohistoquímica para MMP-2. Observe a imunomarkação intensa e homogênea para esta enzima no modelo C6. O detalhe evidencia dois padrões distintos de marcação, uma na superfície das células (setas fechadas) e outro que condiz com a MEC tumoral (setas abertas). **(C)** Imunohistoquímica para o receptor Flt-1. O GBM C6 expressou fortemente este receptor (setas fechadas). A superexpressão de Flt-1 foi observada também nas células migrando pelos vasos (setas abertas). A cicatriz glial expressou o Flt-1 como pode ser observado no detalhe. **(D)** Imunohistoquímica para o receptor Flk-1. O tumor C6 foi apto em expressar Flk-1 e algumas células isoladas apresentaram uma marcação mais intensa. Contudo, a cicatriz glial e o tecido normal ao redor do tumor não expressaram esse receptor como é mostrado no detalhe da imagem.

Prancha 39 - Imunohistoquímicas para a Flt-1 no tumor C6 usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 µm). As reações mostram células C6 dos centros tumorais e migrando por vasos em 5 diferentes animais. **(A)** Centro do tumor 1. **(B,C,D e E)** Células C6 associadas a vasos. Observe células C6 com uma forte imunomarcção para Flt-1. Em E observe uma célula C6 com uma nítida imunomarcção na superfície celular (seta). Em C e E observe que há imunomarcção para Flt-1 também dispersa na matriz extracelular **(F)** Centro do tumor 2. Observe que a expressão de Flt-1 não está restrita à superfície das células e pode ser encontrada permeando a matriz extracelular num padrão de expressão puntiforme. **(G, H, I e J)** Células C6 associadas à vasos do tumor 2. Observe em G e H o que parecem ser expansões citoplasmáticas típicas de uma célula migrante. Em I pode-se observar uma célula C6 fortemente marcada em sua superfície e com uma fina extensão citoplasmática que condiz com a morfologia de uma célula migrante. **(K)** Centro do tumor 3. observe novamente a expressão de Flt-1 permeando a matriz extracelular tumoral. **(L,M,N e O)** Células C6 associadas a vasos do tumor 3. Observe aglomerados de células migrando nos sítios dos vasos peritumorais. Há um preferência nítida de migração dessas células por esses nichos. **(P)** Centro do tumor 4. **(Q, R, S e T)** Células C6 associadas a vasos do tumor 4. Observe em R uma célula C6 com nítidas expansões citoplasmáticas. **(U)** Centro do tumor 5. **(V, W, X, Y)** Células C6 associadas a vasos do tumor 5. Em W observe uma célula C6 com forte expressão de Flt-1 inclusive em sua superfície. Observação: A escala é a mesma para todas as imagens.

Prancha 40 - Imunohistoquímicas para VEGF, FLT-1 e FLK-1 em células C6 em cultivo usando HRP-DAB e contra-coloração dos núcleos com metil-verde. A e B - Controles negativos. C e D - Imunomarcações para VEGF. E e F - Imunomarcações para Flt-1. G e H - Imunomarcações para Flk-1.

Prancha 41 - Imunohistoquímicas para Flk-1 e VEGF em GBM humano usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (cortes em parafina – 5μm). A - Controle negativo. B, C e D - Imunomarcção para Flk-1. E e F - Imunomarcção para VEGF.

Prancha 42 - Imunohistoquímicas para MMP-2 no tumor C6 usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 µm). (A, B e C) - Controles negativos das reações. (D, E e F) - Imunomarcações para MMP-2. Observe a forte expressão nos tumores. A expressão de MMP-2 apresentou esse padrão em todos os animais analisados. Observe ainda que os sítios de alta proliferação dos tumores não apresentaram a expressão de MMP-2 (asteriscos).

Prancha 43 - Imunohistoquímicas para MMP-2 no tumor C6 usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocortes de 20 μm). As reações mostram células C6 dos centros tumorais e migrando por vasos em 4 diferentes animais. **(A)** Centro do tumor 1. **(B, C, D e E)** Células C6 associadas a vasos. Observe células C6 com uma forte imunomarcacão para MMP-2. Em C observe uma célula C6 com uma nítida imunomarcacão na superfície celular (seta). Em D e E observe que há imunomarcacão para MMP-2 em várias células próximas aos vasos peritumorais **(F)** Centro do tumor 2. Observe que a expressão de MMP-2 não está restrita à superfície das células e pode ser encontrada permeando a matriz extracelular. **(G, H, I e J)** Células C6 associadas à vasos do tumor 2. Observe em G e I o que parecem ser expansões citoplasmáticas típicas de uma célula migrante (setas). Em H pode-se observar uma célula C6 fortemente marcada em sua superfície. **(K)** Centro do tumor 3. Observe novamente a expressão de MMP-2 permeando a matriz extracelular tumoral. **(L,M,N e O)** Células C6 associadas a vasos do tumor 3. Observe células migrando nos sítios dos vasos peritumorais. Em M pode-se observar uma célula C6 fortemente marcada migrando pelo vaso e com uma morfologia polarizada típica de uma célula em movimentação. **(P)** Centro do tumor 4. **(Q, R, S, T, U, V, W, X e Y)** Células C6 associadas a vasos do tumor 4. Observe em R células C6 migrando em fila em um vaso de calibre maior. Em X observe a expressão de MMP-2 na superfície de uma célula que morfologicamente pode ser ou uma célula tumoral ou um endoteliócito peritumoral. Observação: a escala é a mesma para todas as imagens.

Prancha 44 - Imunohistoquímica para MMP-2 no tumor C6 usando HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (criocorte de 20 μm). Observe o padrão de marcação de MMP-2 tanto no provável citoplasma e na MEC (setas vermelhas), quanto na superfície das células tumorais (setas pretas). Esse padrão de marcação é condizente com a ativação do MMP-2 que ocorre na superfície da célula. Convém ressaltar que o anticorpo aqui usado marca tanto o MMP-2 ativo, quanto o inativo.

Prancha 45 - Imunohistoquímicas para MMP-2 e MMP-9 em GBM humano usando digestão com tripsina, HRP-DAB intensificado com ósmio e contra-coloração dos núcleos com metil-verde (cortes em parafina – 5 µm). (A) Controle negativo. (B e C) Imunomarcação para MMP-2. (D) Imunomarcação para MMP-9. As imunomarcações de MMP-9 foram muito menos distribuídas nos tumores analisados do que as imunomarcações de MMP-2.

5 CONCLUSÕES

Conjuntamente as análises morfológicas e das distribuições espaciais das moléculas aqui estudadas mostraram que:

- O modelo C6 de tumor cerebral de rato apresenta morfológicamente as características de um GBM pleno como: alta celularidade, áreas de necrose, células em paliçada, bordas difusas, angiogênese pronunciada e alta capacidade infiltrativa nas estruturas cerebrais. O modelo apresentou ainda a migração de células C6 associadas a vasos peritumorais como também foi descrito para tumores humanos. A expressão de B-FABP e a ausência de GFAP indicam ainda a natureza pouco diferenciada do modelo.
- O tumor C6 expressou diversos elementos de MEC (VN, FN, TN-C, colágenos I, III e IV, agrecan, brevican e versican) complementando o substrato disponível no parênquima cerebral. Esses elementos de MEC poderiam contribuir com o fenótipo altamente migratório assim como na proliferação das células tumorais. A VN, a FN, o colágeno tipo I e o versican apresentaram uma expressão aumentada (em comparação com o resto do tumor) nas bordas infiltrativas, sugerindo que esses elementos de MEC apresentam um importante papel na migração das células das bordas do tumor.
- O tumor C6 expressou ainda elementos de MEC constituintes de membrana basal (colágeno IV, FN e VN) que foram depositados nos vasos tumorais e peritumorais, e que servem como sítios de ancoragem para as células neoplásicas. A VN em especial mostrou-se como um eficiente marcador de vasos tumorais e peritumorais no modelo estudado.
- O tumor C6 expressou diversos receptores de superfície para esses elementos de MEC. A forte imunomarcagem de RHAMM e a fraca imunomarcagem de CD44 sugere que o RHAMM (e não o CD44) parece apresentar um papel importante no reconhecimento do ácido hialurônico circundante.
- As subunidades α_v e β_1 das integrinas foram expressas pelo tumor e pelos vasos tumorais e peritumorais. Ambas foram mais fortemente imunomarcadas nas bordas infiltrativas do tumor, o que sugere um importante papel no reconhecimento da MEC neste sítio. A subunidade α_v das integrinas foi ainda um eficiente marcador das células C6 migrando por vasos peritumorais.
- Apesar do modelo C6 ter expressado a MMP-2, não foi possível identificar a expressão de MMP-9. A forte expressão de MMP-2 em diversos sítios tumorais sugere um importante papel dessa enzima proteolítica no remodelamento da MEC circundante.
- O modelo C6 expressou diversas proteínas envolvidas com a angiogênese tumoral, como VEGF, COX-2, flt-1 e flk-1. A expressão do VEGF no tecido ao redor do tumor indica uma indução da angiogênese fora dos limites do mesmo. A expressão desse fator de crescimento na região da cicatriz glial indica que provavelmente não apenas os endoteliócitos e células tumorais, mas também os astrócitos reativos apresentam

papel na indução da angiogênese. As expressões de flt-1 e flk-1 foram observadas nos vasos, como esperado. Contudo, as suas expressões pelas células tumorais, sugere um papel desses receptores não apenas na proliferação dos endoteliócitos, mas também na proliferação tumoral *per se*. A expressão de flt-1 no tumor e no tecido normal/gliótico ao redor do tumor sugere ainda a expressão desse receptor na sua forma solúvel, que poderia ser uma forma de proteger o VEGF da degradação proteolítica.

- O tumor C6 in vivo pode induzir a formação de uma cicatriz glial e as expressões de VEGF, flt-1, RHAMM e TN-R observadas nesse sítio poderiam ser um fator de indução da migração das células C6 infiltrativas.
- Várias moléculas aqui estudadas (VN, FN, versican, colágeno tipo I, TN-C, MMP-2, flt-1, flk-1, subunidades α_v e β_1 das integrinas) apresentaram uma forte expressão em células C6 migrando por vasos peritumorais. A expressão pericelular de muitas dessas moléculas indica uma organização diferenciada e especializada na superfície das células altamente infiltrativas. Essas células são responsáveis pela reincidência da doença e são resistentes aos tratamentos convencionais (quimioterapia e/ou radioterapia) que são essencialmente anti-proliferativos. No presente estudo a maioria das moléculas envolvidas com a migração e invasão não apresentaram uma expressão significativa nos sítios proliferativos dos tumores. Essa não expressão nos sítios proliferativos confirma o que já havia sido descrito por outros pesquisadores, isto é, que as células em divisão no tumor não estão migrando. Para entrar em divisão a célula tumoral precisa parar de migrar. Assim, as células em pleno processo migratório não são afetadas pelos tratamentos clássicos pós-cirúrgicos. Conjuntamente os dados do presente trabalho mostram que para um tratamento futuro eficiente dos GBMs uma abordagem em duas frentes deve ser tomada, um tratamento anti-proliferativo e um tratamento anti-migratório adjuvante. As moléculas acima citadas e que foram fortemente expressas nas células C6 migrando pelos vasos são desta forma potenciais alvos para terapias anti-câncer futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, Y.; JUNG, S.; SALHIA, B.; LEE, S.; HUBBARD, S.; TAYLOR, M.; MAINPRIZE, T.; AKAISHI, K.; VAN FURTH, W.; RUTKA, J.T. Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. **J. Neurooncol.**, v. 53, n. 2, p.115-27, 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**, 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994.
- ALITALO, K.; BORNSTEIN, P.; VAHERI, A.; SAGE, H. Biosynthesis of an unusual collagen type by human astrocytoma cells in vitro. **J. Biol. Chem.**, v.258, n. 4, p. 2653-61, 1983.
- AMBERGER, V.R.; PAGANETTI, P.A.; SEULBERGER, H.; ELDERING, J.A.; SCHWAB, M.E. Characterization of a membrane-bound metalloendoprotease of rat C6 glioblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 54, n. 15, p. 4017-25, 1994.
- ARA, G.; TEICHER, B.A. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in cancer therapy. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 54, n. 1, p. 3-16, 1996.
- ARIZA, A.; LOPEZ, D.; MATE, J.L.; ISAMAT, M.; MUSULEN, E.; PUJOL, M.; LEY, A.; NAVAS-PALACIOS, J.J. Role of CD44 in the invasiveness of glioblastoma multiforme and the noninvasiveness of meningioma: an immunohistochemistry study. **Hum. Pathol.**, v. 26, n. 10, p. 1144-7, 1995.
- ASSMANN, V.; JENKINSON, D.; MARSHALL, J.F.; HART, I.R. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. **J. Cell Sci.**, v. 112, n. 22, p. 3943-54, 1999.
- AUGUSTE, P.; GURSEL, D.B.; LEMIERE, S.; REIMERS, D.; CUEVAS, P.; CARCELLER, F.; DI SANTO, J.P.; BIKFALVI, A. Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. **Cancer Res.**, v. 61, n. 4, p. 1717-26, 2001.
- AVRAMIS, I.A.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; SUZUKI, A.; LAUG, W.E.; GONZALEZ-GOMEZ, I.; MCNAMARA, G.; SAUSVILLE, E.A.; AVRAMIS, V.I. In vitro and in vivo evaluations of the tyrosine kinase inhibitor NSC 680410 against human leukemia and glioblastoma cell lines. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 50, p. 479-89, 2002.
- BADIE, B.; SCHARTNER, J.M.; HAGAR, A.R.; PRABAKARAN, S.; PEEBLES, T.R.; BARTLEY, B.; LAPSIWALA, S.; RESNICK, D.K.; VORPAHL, J. Microglia cyclooxygenase-2 activity in experimental gliomas: possible role in cerebral edema formation. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 872-7, 2003.
- BAFETTI, L.M.; YOUNG, T.N.; ITOH, Y.; STACK, M.S. Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 1, p. 143-9, 1998.
- BAUER, M.K.; LIEB, K.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; BERGER, M.; GEBICKE-HAERTER, P.J.; BAUER, J.; FIEBICH, B.L. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. **Eur. J. Biochem.**, v. 243, p. 726-31, 1997.
- BEHREM, S.; ZARKOVIĆ, K.; ESKINJA, N.; JONJIĆ, N. Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 11, n. 4, p. 229-35, 2005.
- BELIEN, A.T.; PAGANETTI, P.A.; SCHWAB, M.E. Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. **J. Cell Biol.**, v. 144, n. 2, p. 373-84, 1999.
- BELLAIL, A.C.; HUNTER, S.B.; BRAT, D.J.; TAN, C.; VAN MEIR, E.G. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 36, p. 1046-1069, 2004.

- BELLO, L.; FRANCOLINI, M.; MARTHYN, P.; ZHANG, J.; CARROLL, R.S.; NIKAS, D.C.; STRASSER, J.F.; VILLANI, R.; CHERESH, D.A.; BLACK, P.M. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. **Neurosurgery**, v. 49, n. 2, p. 380-9, 2001.
- BELOT, N.; RORIVE, S.; DOYEN, I.; LEFRANC, F.; BRUYNEEL, E.; DEDECKER, R.; MICIK, S.; BROTCHE, J.; DECAESTECKER, C.; SALMON, I.; KISS, R.; CAMBY, I. Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features. **Glia**, v. 36, n. 3, p. 375-90, 2001.
- BERENS, M.E.; RIEF, M.D.; LOO, M.A.; GIESE, A. The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in a microliter scale assay. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 12, n. 6, p. 405-15, 1994.
- BINDER, D.K.; BERGER, M.S. Proteases and the biology of glioma invasion. **J. Neurooncol.**, v. 56, n. 2, p. 149-58, 2002.
- BIOCARTA. **VEGF versus HIPOXIA**. Available from: <<http://www.biocarta.com>>. Acesso em: out. 2006.
- BIOSOURCE INTERNATIONAL. **Integrins versus Growth factors**. Available from: <<http://www.biosourceinternational.com>>. Acesso em: out. 2006.
- BISGROVE, D.A.; MONCKTON, E.A.; PACKER, M.; GODBOUT, R. Regulation of brain fatty acid-binding protein expression by differential phosphorylation of nuclear factor I in malignant glioma cell lines. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 39, p. 30668-76, 2000.
- BJERKVIG, R.; LAERUM, O.D.; RUCKLIDGE, G.J. Immunocytochemical characterization of extracellular matrix proteins expressed by cultured glioma cells. **Cancer Res.**, v. 49, n. 19, p. 5424-8, 1989.
- BOOCOCK, C.A.; CHARNOCK-JONES, D.S.; SHARKEY, A.M.; MCLAREN, J.; BARKER, P.J.; WRIGHT, K.A.; TWENTYMAN, P.R.; SMITH, S.K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 506-16, 1995.
- BOUTERFA, H.; DARLAPP, A.R.; KLEIN, E.; PIETSCH, T.; ROOSEN, K.; TONN, J.C. Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. **J. Neurooncol.**, v. 44, n. 1, p. 23-33, 1999.
- BRAKEBUSCH, C.; BOUVARD, D.; STANCHI, F.; SAKAI, T.; FASSLER, R. Integrins in invasive growth. **J. Clin. Invest.**, v. 109, n. 8, p. 999-1006, 2002.
- BRAKEBUSCH, C.; HIRSCH, E.; POTOCHNIK, A.; FASSLER, R. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. **J. Cell Sci.**, v. 110, n. 23, p. 2895-904, 1997.
- BRODIE, C.; KUPERSTEIN, I.; ACS, P.; BLUMBERG, P.M. Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 56, p. 108-17, 1998.
- BROOKS, P.C.; STROMBLAD, S.; SANDERS, L.C.; VON SCHALSCHA, T.L.; AIMES, R.T.; STETLER-STEVENSON, W.G.; QUIGLEY, J.P.; CHERESH, D.A. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 683-93, 1996.
- BROWN, E.J. Integrin-associated proteins. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 14, n. 5, p. 603-7, 2002.
- BRUNNER, G.; REIMBOLD, K.; MEISSAUER, A.; SCHIRRMACHER, V.; ERKELL, L.J. Sulfated glycosaminoglycans enhance tumor cell invasion in vitro by stimulating plasminogen activation. **Exp. Cell Res.**, v. 239, n. 2, p. 301-10, 1998.
- BURNS, G.F.; LUCAS, C.M.; KRISANSSEN, G.W.; WERKMEISTER, J.A.; SCANLON, D.B.; SIMPSON, R.J.; VADAS, M.A. Synergism between membrane gangliosides and Arg-Gly-Asp-directed glycoprotein receptors in attachment to matrix proteins by melanoma cells. **J. Cell Biol.**, v. 107, p. 1225-30, 1988.

- CAFFO, M.; GERMANO, A.; CARUSO, G.; MELI, F.; GALATIOTO, S.; SCIACCA, M.P.; TOMASELLO, F. An immunohistochemical study of extracellular matrix proteins laminin, fibronectin and type IV collagen in paediatric glioblastoma multiforme. **Acta Neurochir.**, v. 146, n. 10, p. 1113-8, 2004.
- CAO, Y.; PRESCOTT, S.M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **J. Cell Physiol.**, v. 190, p. 279-86, 2002.
- CARBONELL, A.L.; BOYA, J. Ultrastructural study on meningeal regeneration and meningo-glial relationships after cerebral stab wound in the adult rat. **Brain Res.**, v. 439, p. 337-44, 1988.
- CARNEMOLLA, B.; LEPRINI, A.; BORSI, L.; QUERZE, G.; URBINI, S.; ZARDI, L. Human tenascin-R. Complete primary structure, pré-mRNA alternative splicing and gene localization on chromosome 1q23-q24. **J. Biol. Chem.**, v. 14, p. 8157-60, 1996.
- CASTELLANI, P.; BORSI, L.; CARNEMOLLA, B.; BIRO, A.; DORCARATTO, A.; VIALE, G.L.; NERI, D.; ZARDI, L. Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 5, p. 1695-700, 2002.
- CELIO, M.R.; BLUMCKE, I. Perineuronal nets: a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. **Brain Res. Rev.**, v. 19, p. 128-45, 1994.
- CELIO, M.R.; SPREAFICO, R.; DE BIASI, S.; VITELLARO-ZUCCARELLO, L. Perineuronal nets: past and present. **TINS**, v. 21, p. 510-5, 1998.
- CHEKENYA, M.; HJELSTUEN, M.; ENGER, P.O.; THORSEN, F.; JACOB, A.L.; PROBST, B.; HARALDSETH, O.; PILKINGTON, G.; BUTT, A.; LEVINE, J.M.; BJERKVIG, R. NG2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in CNS by sequestering angiostatin. **FASEB J.**, v. 16, n. 6, p. 586-8, 2002b.
- CHENG, S.Y.; NAGANE, M.; HUANG, H.S.; CAVENEE, W.K. Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 22, p. 12081-7, 1997.
- CHEUNG, N.K.V.; SAARINEN, U.M.; NEELY, J.E.; LANDMEIER, B.; DONOVAN, D.; COCCIA, P.F. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 45, p. 2642-49, 1985.
- CHINTALA, S.K.; SAWAYA, R.; GOKASLAN, Z.L.; FULLER, G.; RAO, J.S. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in human glioma, both in vivo and in vitro. **Cancer Lett.**, v. 101, n. 1, p. 107-14, 1996a.
- CHINTALA, S.K.; SAWAYA, R.; GOKASLAN, Z.L.; RAO, J.S. Modulation of matrix metalloproteinase-2 and invasion in human glioma cells by alpha 3 beta 1 integrin. **Cancer Lett.**, v. 103, n. 2, p. 201-8, 1996b.
- CHINTALA, S.K.; TONN, J.C.; RAO, J.S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 17, n. 5-6, p. 495-502, 1999.
- CHOE, G.; PARK, J.K.; JOUBEN-STEELE, L.; KREMEN, T.J.; LIAU, L.M.; VINTERS, H.V.; CLOUGHESY, T.F.; MISCHER, P.S. Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, n. 9, p. 2894-901, 2002.
- CLAESSON-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n. 1, p. 20-4, 2003.
- CLUBB, B.H.; SHIVERS, R.R. Extracellular matrix regulates microfilament and vinculin organization in C6-glioma cells. **Acta Neuropathol.**, v. 91, n. 1, p. 31-40, 1996.
- COUCHMAN, J.R.; REES, D.A.; GREEN, M.R.; SMITH, C.G. Fibronectin has a dual role in locomotion and anchorage of primary chick fibroblasts and can promote entry into the division cycle. **J. Cell Biol.**, v. 93, n. 2, p. 402-10, 1982.

- DAMERT, A.; IKEDA, E.; RISAU, W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. **Biochem. J.**, v. 327, p. 419-23, 1997.
- DANIEL, T.O.; LIU, H.; MORROW, J.D.; CREWS, B.C.; MARNETT, L.J. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 59, p. 4574-7, 1999.
- DAY, A.J.; PRESTWICH, G.D. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 7, p. 4585-8, 2002.
- DEININGER MH, SCHLUESENER HJ. Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. **J. Neuroimmunol.**, v. 95, p. 202-8, 1999.
- DEININGER, M.H.; WELLER, M.; STREFFER, J.; MITTELBRONN, M.; MEYERMANN, R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. **Acta Neuropathol.**, v. 98, p. 240-4, 1999.
- DELATTRE, J.Y.; UCHUYA, M. Radiotherapy and chemotherapy for gliomas. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 8, n. 3, p. 196-203, 1996.
- DERYUGINA, E.I.; BOURDON, M.A.; LUO, G.X.; REISFELD, R.A.; STRONGIN, A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. **J. Cell Sci.**, v. 110, p. 2473-82, 1997.
- DERYUGINA, E.I.; SOROCEANU, L.; STRONGIN, A.Y. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 62, n. 2, p. 580-8, 2002.
- DOHADWALA, M.; LUO, J.; ZHU, L.; LIN, Y.; DOUGHERTY, G.J.; SHARMA, S.; HUANG, M.; POLD, M.; BATRA, R.K.; DUBINETT, S.M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 24, p. 20809-12, 2001.
- DOW, K.E.; WANG, W. Cell biology of astrocyte proteoglycans. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 54, n. 6, p. 567-81, 1998.
- EINHEBER, S.; SCHNAPP, L.M.; SALZER, J.L.; CAPPIELLO, Z.B.; MILNER, T.A. Regional and ultrastructural distribution of the alpha 8 integrin subunit in developing and adult rat brain suggests a role in synaptic function. **J. Comp. Neurol.**, v. 370, n. 1, p. 105-34, 1996.
- ELICEIRI, B.P.; CHERESH, D.A. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 9, p. 1227-30, 1999.
- EMDBIOSCIENCES. **VEGF Pathway**. Available from: <<http://www.emdbiosciences.com>>. Acesso em: out. 2006.
- EVANKO, S.P.; WIGHT, T.N. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 47, p. 1331-42, 1999.
- FAISSNER, A.; KRUSE, J.; KÜHN, K.; SCHACHNER, M. Binding of the J1 adhesion molecules to extracellular matrix constituents. **J. Neurochem.**, v. 54, p. 1004-15, 1990.
- FARIN, A.; SUZUKI, S.O.; WEIKER, M.; GOLDMAN, J.E.; BRUCE, J.N.; CANOLL, P. Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. **Glia**, v. 53, n. 8, p. 799-808, 2006.
- FAWCETT, J.W.; ASHER, R.A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain. Res. Bull.**, v. 49, p. 377-91, 1999.
- FERRARA N.; GERBER, H.P.; LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, v. 9, p. 669-76, 2003.
- FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr. Rev.**, v. 25, p. 581-611, 2004.

- FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr. Rev.**, v. 18, p. 4-25, 1997.
- FILLMORE, H.L.; VANMETER, T.E.; BROADDUS, W.C. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. **J. Neurooncol.**, v. 53, n. 2, p. 187-202, 2001.
- FISCHER, I.; GAGNER, J.P.; LAW, M.; NEWCOMB, E.W.; ZAGZAG, D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. **Brain. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 297-310, 2005.
- FONG, G.H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, n. 6535, p. 66-70, 1995.
- FORSYTH, P.A.; WONG, H.; LAING, T.D.; REWCASTLE, N.B.; MORRIS, D.G.; MUZIK, H.; LECO, K.J.; JOHNSTON, R.N.; BRASHER, P.M.; SUTHERLAND, G.; EDWARDS, D.R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. **Br. J.Cancer**, v. 79, n. 11-12, p. 1828-35, 1999.
- FOX, K.; CATERSON, B. Neuroscience: Freeing the brain from the perineuronal net. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1187-9, 2002.
- FRANK, S.; RIHS, H.P.; STOCKER, W.; MULLER, J.; DUMONT, B.; BAUR, X.; SCHACKERT, H.K.; SCHACKERT, G. Combined detection of CD44 isoforms by exon-specific RT-PCR and immunohistochemistry in primary human brain tumors and brain metastases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 222, n. 3, p. 794-801, 1996.
- FRISEN, J.; JOHANSSON, C.B.; TOROK, C.; RISLING, M.; LENDAHL, U. Rapid, widespread, and long lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. **J. Cell Biol.**, v. 131, p. 453-64, 1995.
- FUKUSHIMA, Y.; OHNISHI, T.; ARITA, N.; HAYAKAWA, T.; SEKIGUCHI, K. Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells. **Int. J. Cancer**, v. 76, n. 1, p. 63-72, 1998.
- FUSS, B.; WINTERGERST, E.S.; BARTSCH, U.; SCHACHNER, M. Molecular characterization and in situ messenger RNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. **J. Cell Biol.**, v. 120, p. 1237-49, 1993.
- GALANIS, E.; BUCKNER, J.C. Chemotherapy of brain tumors. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 13, n. 6, p. 619-25, 2000.
- GARY, S.C.; KELLY, G.M.; HOCKFIELD, S. BEHAB/brevican: a brain-specific lectican implicated in gliomas and glial cell motility. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 8, n. 5, p. 576-81, 1998.
- GARY, S.C.; ZERILLO, C.A.; CHIANG, V.L.; GAW, J.U.; GRAY, G.; HOCKFIELD, S. cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma. **Gene**, v. 256, n. 1-2, p. 139-47, 2000.
- GENG, L.; DONNELLY, E.; MCMAHON, G.; LIN, P.C.; SIERRA-RIVERA, E.; OSHINKA, H.; HALLAHAN, D.E. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. **Cancer Res.**, v. 61, n. 6, p. 2413-9, 2001.
- GIESE, A.; BJERKVIG, R.; BERENS, M.E.; WESTPHAL, M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p.1624-36, 2003.
- GIESE, A.; LOO, M.A.; NORMAN, S.A.; TREASURYWALA, S.; BERENS, M.E. Contrasting migratory response of astrocytoma cells to tenascin mediated by different integrins. **J. Cell Sci.**, v. 109, p. 2161-8, 1996.
- GIESE, A.; LOO, M.A.; RIEF, M.D.; TRAN, N.; BERENS, M.E. Substrates for astrocytoma invasion. **Neurosurgery**, v. 37, n. 2, p. 294-301, 1995.

- GIESE, A.; RIEF, M.D.; LOO, M.A.; BERENS, M.E. Determinants of human astrocytoma migration. **Cancer Res.**, v. 54, n. 14, p. 3897-904, 1994.
- GINGRAS, D.; PAGE, M.; ANNABI, B.; BELIVEAU, R. Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1497, n. 3, p.341-50, 2000.
- GINGRAS, M.C.; ROUSSEL, E.; BRUNER, J.M.; BRANCH, C.D.; MOSER, R.P. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. **J. Neuroimmunol.**, v. 57, n. 1-2, p. 143-53, 1995.
- GIVANT-HORWITZ, V.; DAVIDSON, B.; REICH, R. Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor. **Cancer Res.**, v. 64, n. 10, p. 3572-9, 2004.
- GLADSON, C.L. Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastomas tumors. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 55, n. 11, p. 1143-9, 1996.
- GLADSON, C.L. The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 58, n. 10, p. 1029-40, 1999.
- GLADSON, C.L.; CHERESH, D.A. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 88, n. 6, p. 1924-32, 1991.
- GLADSON, C.L.; WILCOX, J.N.; SANDERS, L.; GILLESPIE, G.Y.; CHERESH, D.A. Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 947-56, 1995.
- GLATZ, J.F.; VAN DER VUSSE, G.J. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. **Prog. Lipid Res.**, v. 35, n. 3, p. 243-82, 1996.
- GLYCOFORUM. **Repeating disaccharide units of various glycosaminoglycans**. Available from: <<http://www.glycoforum.gr.jp>>. Acesso em: out. 2006a
- GLYCOFORUM. **A structural model of aggrecan and PG-M/versican**. Available from: <<http://www.glycoforum.gr.jp>>. Acesso em: out. 2006b
- GODBOUT, R.; BISGROVE, D.A.; SHKOLNY, D.; DAY, R.S. 3RD. Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. **Oncogene**, v. 16, n. 15, p. 1955-62, 1998.
- GOLDBERG, W.J.; LEVINE, K.V.; TADVALKAR, G.; LAWS, E.R JR.; BERNSTEIN, J.J. Mechanisms of C6 glioma cell and fetal astrocyte migration into hydrated collagen I gels. **Brain Res.**, v. 581, n. 1, p. 81-90, 1992.
- GOLDBRUNNER, R.H.; BERNSTEIN, J.J.; PLATE, K.H.; VINCE, G.H.; ROOSEN, K.; TONN, J.C. Vascularization of human glioma spheroids implanted into rat cortex (Abstract). **J. Neurooncol.**, v. 35, n. 1, p. 18, 1997.
- GOLDBRUNNER, R.H.; BERNSTEIN, J.J.; TONN, J.C. ECM-mediated glioma cell invasion. **Microsc. Res. Tech.**, v. 43, n. 3, p. 250-7, 1998.
- GONZALEZ, A.M.; GONZALES, M.; HERRON, G.S.; NAGAVARAPU, U.; HOPKINSON, S.B.; TSURUTA, D.; JONES, J.C. Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior in vitro and angiogenesis in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 25, p. 16075-80.
- GRAEVEN, U.; FIEDLER, W.; KARPINSKI, S.; ERGUN, S.; KILIC, N.; RODECK, U.; SCHMIEGEL, W.; HOSSFELD, D.K. Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 125, p. 621-9, 1999.
- GREWAL, S.; HERBERT, S.P.; PONNAMBALAM, S.; WALKER, J.H. Cytosolic phospholipase A2-alpha and cyclooxygenase-2 localize to intracellular membranes of EA.hy.926 endothelial cells that are distinct from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. **FEBS J.**, v. 5, p. 1278-90, 2005.

- GROOMS, S.Y.; TERRACIO, L.; JONES, L.S. Anatomical localization of beta 1 integrin-like immunoreactivity in rat brain. **Exp. Neurol.**, v. 122, n. 2, p. 253-9, 1993.
- GRUMET, M.; MILEV, P.; SAKURAI, T.; KARTHIKEYAN, L.; BOURDON, M.; MARGOLIS, R.K.; MARGOLIS, R.U. Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 16, p. 12142-6, 1994.
- GUO, P.; XU, L.; PAN, S.; BREKKEN, R.A.; YANG, S.T.; WHITAKER, G.B.; NAGANE, M.; THORPE, P.E.; ROSENBAUM, J.S.; SU HUANG, H.J.; CAVENEE, W.K.; CHENG, S.Y. Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites. **Cancer Res.**, v. 61, n. 23, p. 8569-77, 2001.
- GUO, W.; GIANCOTTI, F.G. Integrin signalling during tumour progression. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 10, p. 816-26, 2004.
- 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.**, v. 764, p. 17-27, 1997.
- HAGIHARA, K.; MIURA, R.; KOSAKI, R.; BERGLUND, E.; RANSCHT, B.; YAMAGUCHI, Y. Immunohistochemical evidence for the brevicin-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 410, n. 2, p. 256-64, 1999.
- HALFTER, W.; REINHARD, E.; LIVERANI, D.; ORTMAN, R.; MONARD, D. Immunocytochemical localization of glia-derived nexin, laminin and fibronectin on the surface or extracellular matrix of C6 rat glioma cells, astrocytes and fibroblasts. **Eur. J. Neurosci.**, v. 1, p. 297-308, 1989.
- HAMEL, W.; WESTPHAL, M. Growth factors in gliomas revisited. **Acta Neurochir.**, v. 142, p. 113-38, 2000.
- HAN, X.; STEWART, J.E. JR.; BELLIS, S.L.; BENVENISTE, E.N.; DING, Q.; TACHIBANA, K.; GRAMMER, J.R.; GLADSON, C.L. TGF-beta1 up-regulates paxillin protein expression in malignant astrocytoma cells: requirement for a fibronectin substrate. **Oncogene**, v. 20, n. 55, p. 7976-86, 2001.
- HARA, A.; OKAYASU, I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. **Acta Neuropathol.**, v. 108, p. 43-8, 2004.
- HAYEN, W.; GOEBELER, M.; KUMAR, S.; RIESSEN, R.; NEHLS, V. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. **J. Cell. Sci.**, v. 112, p. 2241-51, 1999.
- HEROLD-MENDE, C.; MUELLER, M.M.; BONSANTO, M.M.; SCHMITT, H.P.; KUNZE, S.; STEINER, H.H. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. **Int. J. Cancer.**, v. 98, n. 3, p. 362-9, 2002.
- HEROLD-MENDE, C.; STEINER, H.H.; ANDL, T.; RIEDE, D.; BUTTLER, A.; REISSER, C.; FUSENIG, N.E.; MUELLER, M.M. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. **Lab. Invest.**, v. 79, p. 1573-82, 1999.
- HIRATSUKA, S.; MINOWA, O.; KUNO, J.; NODA, T.; SHIBUYA, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 95, n. 16, p. 9349-54, 1998.
- HOMSI, J.; DAUD, A.I. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. **Cancer Control**, v. 14, n. 3, p. 285-94, 2007.
- HU, B.; JARZYNSKA, M.J.; GUO, P.; IMANISHI, Y.; SCHLAEPFER, D.D.; CHENG, S.Y. Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the alphavbeta1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. **Cancer Res.**, v. 66, n. 22, p. 775-83, 2006.

- HUANG, W.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; MOYANO, J.V.; GARCIA-PARDO, A.; OREND, G. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. **Cancer Res.**, v. 61, n. 23, p. 8586-94, 2001.
- IOZZO, R.V.; SAN ANTONIO, J.D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 349-55, 2001.
- JACKSON, M.W.; ROBERTS, J.S.; HECKFORD, S.E.; RICCIARDELLI, C.; STAHL, J.; CHOONG, C.; HORSFALL, D.J.; TILLEY, W.D. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. **Cancer Res.**, v. 62, p. 854-9, 2002.
- JAWORSKI, D.M.; KELLY, G.M.; HOCKFIELD, S. Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the cns-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. **Exp. Neurol.**, v. 157, p. 327-337, 1999.
- JAWORSKI, D.M.; KELLY, G.M.; HOCKFIELD, S. The CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB is expressed in ventricular zones coincident with gliogenesis. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 2, p. 1352-62, 1995.
- JAWORSKI, D.M.; KELLY, G.M.; PIEPMEIER, J.M.; HOCKFIELD, S. BEHAB (brain enriched hyaluronan binding) is expressed in surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive glioma cell lines. **Cancer Res.**, v. 56, n. 10, p. 2293-8, 1996.
- JOESTER, A.; FAISSNER, A. The structure and function of tenascins in the nervous system. **Matrix Biol.**, v. 20, n. 1, p. 13-22, 2001.
- JOKI, T.; HEESE, O.; NIKAS, D.C.; BELLO, L.; ZHANG, J.; KRAEFT, S.K.; SEYFRIED, N.T.; ABE, T.; CHEN, L.B.; CARROLL, R.S.; BLACK, P.M. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. **Cancer Res.**, v. 60, p. 4926-31, 2000.
- JONES, P.L.; JONES, F.S. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. **Matrix Biol.**, v. 19, n. 7, p. 581-96, 2000.
- JUCKER, M.; TIAN, M.; INGRAM, D.K. Laminins in the adult and aged brain. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 28, p. 209-18, 1996.
- KACHRA, Z.; BEAULIEU, E.; DELBECCHI, L.; MOUSSEAU, N.; BERTHELET, F.; MOUMDJIAN, R.; DEL MAESTRO, R.; BELIVEAU, R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 17, n. 7, p. 555-66, 1999.
- KAUR, B.; TAN, C.; BRAT, D.J.; POST, D.E.; VAN MEIR, E.G. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. **J. Neurooncol.**, v. 70, p. 229-43, 2004.
- KE, L.D.; SHI, Y.X.; YUNG, W.K. VEGF(121), VEGF(165) overexpression enhances tumorigenicity in U251 MG but not in NG-1 glioma cells. **Cancer Res.**, v. 62, n. 6, p. 1854-61, 2002.
- KENDALL, R.L.; WANG, G.; THOMAS, K.A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 226, p. 324-8, 1996.
- KETTEMAN, H.; RANSON, B.R. **Neuroglia**. New York: Oxford University Press, 1995. cap.69, 1044-1058.
- KIM, C.H.; BAK, K.H.; KIM, Y.S.; KIM, J.M.; KO, Y.; OH, S.J.; KIM, K.M.; HONG, E.K. Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. **Surg. Neurol.**, v. 54, n. 3, p. 235-40, 2000.
- KISHIMA, H.; SHIMIZU, K.; TAMURA, K.; MIYAO, Y.; MABUCHI, E.; TOMINAGA, E.; MATSUZAKI, J.; HAYAKAWA, T. Monoclonal antibody ONS-M21 recognizes integrin alpha3 in gliomas and medulloblastomas. **Br. J. Cancer**, v. 79, n. 2, p. 333-9, 1999.
- KITA, D.; TAKINO, T.; NAKADA, M.; TAKAHASHI, T.; YAMASHITA, J.; SATO, H. Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. **Cancer Res.**, v. 61, n. 21, p. 7985-91, 2001.

- KLEIHUES, P.; SOYLEMEZOGLU, F.; SCHAUBLE, B.; SCHEITHAUER, B.W.; BURGER, P.C. Histopathology, classification, and grading of gliomas. **Glia**, v. 15, n. 3, p. 211-21, 1995.
- KNOTT, J.C.; MAHESPARAN, R.; GARCIA-CABRERA, I.; BOLGE TYSNES, B.; EDVARDSEN, K.; NESS, G.O.; MORK, S.; LUND-JOHANSEN, M.; BJERKVIG, R. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. **Int. J. Cancer**, v. 75, n. 6, p. 864-72, 1998.
- KNÜPFER, M.M.; POPPENBORG, H.; HOTFILDER, M.; KUHNEL, K.; WOLFF, J.E.; DOMULA, M. CD44 expression and hyaluronic acid binding of malignant glioma cells. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 17, n. 1, p. 71-6, 1999.
- KRUM, J.M.; ROSENSTEIN, J.M. VEGF mRNA and its receptor flt-1 are expressed in reactive astrocytes following neural grafting and tumor cell implantation in the adult CNS. **Exp. Neurol.**, v. 154, p. 57-65, 1998.
- KURTZ, A.; ZIMMER, A.; SCHNÜTGEN, F.; BRÜNING, G.; SPENER, F.; MÜLLER, T. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. **Development**, v. 120, p. 2637-49, 1994.
- LAKKA, S.S.; JASTI, S.L.; GONDI, C.; BOYD, D.; CHANDRASEKAR, N.; DINH, D.H.; OLIVERO, W.C.; GUJRATI, M.; RAO, J.S. Downregulation of MMP-9 in ERK-mutated stable transfectants inhibits glioma invasion in vitro. **Oncogene**, v. 21, n. 36, p. 5601-8, 2002a.
- LAKKA, S.S.; RAJAN, M.; GONDI, C.; YANAMANDRA, N.; CHANDRASEKAR, N.; JASTI, S.L.; ADACHI, Y.; SIDDIQUE, K.; GUJRATI, M.; OLIVERO, W.; DINH, D.H.; KOURAKLIS, G.; KYRITSIS, A.P.; RAO, J.S. Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion. **Oncogene**, v. 21, n. 52, p. 8011-9, 2002b.
- LAMSZUS, K.; ULBRICHT, U.; MATSCHKE, J.; BROCKMANN, M.A.; FILLBRANDT, R.; WESTPHAL, M. Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, n. 4, p. 1399-405, 2003.
- LEE, J.W.; JULIANO, R. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. **Mol. Cells**, v. 17, n. 2, p. 188-202, 2004.
- LEE, J.Y.; SPICER, A.P. Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v. 12, p. 581-6, 2000.
- LEFRANC, F.; BROTCCHI, J.; KISS, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, n. 10, p. 2411-22, 2005.
- LEVY, G.N. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. **FASEB J.**, v. 11, n. 4, p. 234-47, 1997.
- LI, H.; HAMOU, M.F.; DE TRIBOLET, N.; JAUFEERALLY, R.; HOFMANN, M.; DISERENS, A.C.; VAN MEIR, E.G. Variant CD44 adhesion molecules are expressed in human brain metastases but not in glioblastomas. **Cancer Res.**, v. 53, n. 22, p. 5345-9, 1993a.
- LI, X.M.; QI, J.; JUORIO, A.V.; BOULTON, A.A. Reduction in glial fibrillary acidic protein mRNA abundance induced by (-)-deprenyl and other monoamine oxidase B inhibitors in C6 glioma cells. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 1573-6, 1993b.
- LIANG, Y.; DIEHN, M.; WATSON, N.; BOLLEN, A.W.; ALDAPE, K.D.; NICHOLAS, M.K.; LAMBORN, K.R.; BERGER, M.S.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; ISRAEL, M.A. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 16, p. 5814-9, 2005.
- LIES, P.; KAUPPILA, T. Induction of type IV collagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. **Exp. Neurol.**, v. 173, p. 31-45, 2002.

- LIOTTA, L.A. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial. Award lecture. **Cancer Res.**, v. 46, n. 1, p. 1-7, 1986.
- LJUBIMOVA, J.Y.; FUGITA, M.; KHAZENZON, N.M.; DAS, A.; PIKUL, B.B.; NEWMAN, D.; SEKIGUCHI, K.; SOROKIN, L.M.; SASAKI, T.; BLACK, K.L. Association between laminin-8 and glial tumor grade, recurrence, and patient survival. **Cancer**, v. 101, n. 3, p. 604-12, 2004.
- LJUBIMOVA, J.Y.; LAKHTER, A.J.; LOKSH, A.; YONG, W.H.; RIEDINGER, M.S.; MINER, J.H.; SOROKIN, L.M.; LJUBIMOV, A.V.; BLACK, K.L. Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. **Cancer Res.**, v. 61, n. 14, p. 5601-10, 2001.
- LOKESHWAR, V.B.; FREGIEN, N.; BOURGUIGNON, L.Y. Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. **J. Cell. Biol.**, v. 126, n. 4, p. 1099-109, 1994.
- LOPES, M.B. Angiogenesis in brain tumors. **Microsc. Res. Tech.**, v. 60, p. 225-230, 2003.
- LOUIS, D.N.; HOLLAND, E.C.; CAIRNCROSS, J.G. Glioma classification: a molecular reappraisal. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 3, p. 779-86, 2001.
- LOUIS, D.N.; POMEROY, S.L.; CAIRNCROSS, J.G. Focus on central nervous system neoplasia. **Cancer Cell**, v. 1, n. 2, p. 125-8, 2002.
- LYNN, B.D.; LI, X.; CATTINI, P.A.; TURLEY, E.A.; NAGY, J.I. Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 439, n. 3, p. 315-30, 2001.
- MARRET, S.; DELPECH, B.; DELPECH, A.; ASOU, H.; GIRARD, N.; COUREL, M.N.; CHAUZY, C.; MAINGONNAT, C.; FESSARD, C. Expression and effects of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in newborn rat brain glial cell cultures. **J. Neurochem.**, v. 62, n. 4, p. 1285-95, 1994.
- MATTHEWS, R.T.; GARY, S.C.; ZERILLO, C.; PRATTA, M.; SOLOMON, K.; ARNER, E.C.; HOCKFIELD, S. Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 30, p. 22695-703, 2000.
- MATTHEWS, R.T.; KELLY, G.M.; ZERILLO, C.A.; GRAY, G.; TIEMEYER, M.; HOCKFIELD, S. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 17, p. 7536-47, 2002.
- MAXWELL, C.A.; KEATS, J.J.; CRAINIE, M.; SUN, X.; YEN, T.; SHIBUYA, E.; HENDZEL, M.; CHAN, G.; PILARSKI, L.M. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. **Mol. Biol. Cell**, v. 14, n. 6, p. 2262-76, 2003.
- MCGRAW, J.; HIEBERT, G.W.; STEEVES, J.D. Modulating astrogliosis after neurotrauma. **J. Neurosci. Res.**, v. 63, p. 109-15, 2001.
- MCKEEVER, P.E.; FLIGIEL, S.E.; VARANI, J.; HUDSON, J.L.; SMITH, D.; CASTLE, R.L.; MCCOY, J.P. Products of cells cultured from gliomas. IV. Extracellular matrix proteins of gliomas. **Int. J. Cancer**, v. 37, n. 6, p. 867-74, 1986.
- MCKEON, R.J.; HOKE, A.; SILVER, J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. **Exp. Neurol.**, v. 136, p. 32-43, 1995.
- MENDES DE AGUIAR, C.B.; GARCEZ, R.C.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A.G. Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 20, n. 7, p. 563-71, 2002.
- MENTLEIN, R.; HELD-FEINDT, J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy? **Naturwissenschaften**, v. 90, p. 385-94, 2003.

- MERCURIO, A.M.; RABINOVITZ, I. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion-lessons from the alpha6beta 4 integrin. **Semin. Cancer Biol.**, v. 11, n. 2, p. 129-41, 2001.
- MERZAK, A.; KOOCHECKPOUR, S.; PILKINGTON, G.J. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. **Cancer Res.**, v. 54, n. 15, p. 3988-92, 1994.
- MILEV, P.; MAUREL, P.; CHIBA, A.; MEVISSSEN, M.; POPP, S.; YAMAGUCHI, Y.; MARGOLIS, R.K.; MARGOLIS, R.U. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 247, n. 2, p. 207-12, 1998.
- MILNER, R.; HUANG, X.; WU, J.; NISHIMURA, S.; PYTELA, R.; SHEPPARD, D.; FFRENCH-CONSTANT, C. Distinct roles for astrocyte alphavbeta5 and alphavbeta8 integrins in adhesion and migration. **J. Cell Sci.**, v. 112, n. 23, p. 4271-9, 1999.
- MIZEJEWSKI, G.J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 222, n. 2, p. 124-38, 1999.
- MOHANAM, S.; WANG, S.W.; RAYFORD, A.; YAMAMOTO, M.; SAWAYA, R.; NAKAJIMA, M.; LIOTTA, L.A.; NICOLSON, G.L.; STETLER-STEVENSON, W.G.; RAO, J.S. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 13, n. 1, p. 57-62, 1995.
- MOHAPATRA, S.; YANG, X.; WRIGHT, J.A.; TURLEY, E.A.; GREENBERG, A.H. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 4, p. 1663-8, 1996.
- MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M.K.; OTTO, J.C.; HORI, T.; DEWITT, D.L.; SMITH, W.L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, v. 18, p. 10902-8, 1995.
- NAGANUMA, H.; SATOH, E.; ASAHARA, T.; AMAGASAKI, K.; WATANABE, A.; SATOH, H.; KURODA, K.; ZHANG, L.; NUKUI, H. Quantification of thrombospondin-1 secretion and expression of alphavbeta3 and alpha3beta1 integrins and syndecan-1 as cell-surface receptors for thrombospondin-1 in malignant glioma cells. **J. Neurooncol.**, v. 70, n. 3, p. 309-17, 2004.
- NAGASHIMA, G.; SUZUKI, R.; ASAI, J.; FUJIMOTO, T. Immunohistochemical analysis of reactive astrocytes around glioblastoma: an immunohistochemical study of postmortem glioblastoma cases. **Clin. Neurol. Neurosurg.**, v. 104, p. 125-31, 2002.
- NAGY, J.I.; HACKING, J.; FRANKENSTEIN, U.N.; TURLEY, E.A. Requirement of the hyaluronan receptor RHAMM in neurite extension and motility as demonstrated in primary neurons and neuronal cell lines. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 241-52, 1995.
- NAKAGAWA, T.; KUBOTA, T.; KABUTO, M.; SATO, K.; KAWANO, H.; HAYAKAWA, T.; OKADA, Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. **J. Neurosurg.**, v. 81, n. 1, p. 69-77, 1994.
- NATHOO, N.; BARNETT, G.H.; GOLUBIC, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **J. Clin. Pathol.**, v. 57, p. 6-13, 2004.
- NEDERMAN, T.; NORLING, B.; GLIMELIUS, B.; CARLSSON, J.; BRUNK, U. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. **Cancer. Res.**, v. 44, n. 7, p. 3090-7, 1984.
- NOVAK, U.; KAYE, A.H. Extracellular matrix and the brain: components and function. **J. Clin. Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 280-290, 2000.
- NUTT, C.L.; MATTHEWS, R.T.; HOCKFIELD, S. Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican. **Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 113-22, 2001a.

- NUTT, C.L.; ZERILLO, C.A.; KELLY, G.M.; HOCKFIELD, S. Brain enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican increases aggressiveness of CNS-1 gliomas in Lewis rats. **Cancer Res.**, v. 61, n. 19, p. 7056-9, 2001b.
- 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**, v. 15, n. 5, p. 538-46, 1997.
- OHNISHI, T.; HIRAGA, S.; IZUMOTO, S.; MATSUMURA, H.; KANEMURA, Y.; ARITA, N.; HAYAKAWA, T. Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 16, n. 8, p. 729-41, 1998.
- OLIVER, L.; TREMBLAIS, K.; GURIEC, N.; MARTIN, S.; MEFLAH, K.; MENANTEAU, J.; VALLETTE, F.M. Influence of bcl-2-related proteins on matrix metalloproteinase expression in a rat glioma cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 273, n. 2, p. 411-6, 2000.
- OOHIRA, A.; MATSUI, F.; TOKITA, Y.; YAMAUCHI, S.; AONO, S. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 374, n. 1, p. 24-34, 2000.
- PANKOV, R.; YAMADA, K.M. Fibronectin at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 3861-3, 2002.
- PARK, M.J.; KIM, M.S.; PARK, I.C.; KANG, H.S.; YOO, H.; PARK, S.H.; RHEE, C.H.; HONG, S.I.; LEE, S.H. PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. **Cancer Res.**, v. 62, n. 21, p. 6318-22, 2002.
- PARSA, A.T.; CHAKRABARTI, I.; HURLEY, P.T.; CHI, J.H.; HALL, J.S.; KAISER, M.G.; BRUCE, J.N. Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy. **Neurosurgery**, v. 47, n. 4, p. 993-1000, 2000.
- PAULUS, W.; BAUR, I.; BEUTLER, A.S.; REEVES, S.A. Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. **Lab. Invest.**, v. 75, n. 6, p. 819-26, 1996.
- PAULUS, W.; BAUR, I.; SCHUPPAN, D.; ROGGENDORF, W. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. **Am. J. Pathol.**, v. 143, n. 1, p. 154-63, 1993.
- PAULUS, W.; HUETTNER, C.; TONN, J.C. Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. **Int. J. Cancer**, v. 58, n. 6, p. 841-6, 1994.
- PAULUS, W.; ROGGENDORF, W.; SCHUPPAN, D. Immunohistochemical investigation of collagen subtypes in human glioblastomas. **Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 413, n. 4, p. 325-32, 1988.
- PAULUS, W.; TONN, J.C. Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. **J. Neurosurg.**, v. 80, n. 3, p. 515-9, 1994.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 4. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1998.
- PEDERSEN, P.H.; RUCKLIDGE, G.J.; MORK, S.J.; TERZIS, A.J.A.; ENGBRAATEN, O.; LUND-JOHANSEN, M.; BACKLUND, E.O.; LAERUM, O.D.; BJERKVIG, R. Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 86, p. 1593-99, 1994.
- PEOCH, M.; FARION, R.; HIOU, A.; LE BAS, J.F.; PASQUIER, B.; REMY, C. Immunohistochemical study of VEGF, angiopoietin 2 and their receptors in the neovascularization following microinjection of C6 glioma cells into rat brain. **Anticancer Res.**, v. 22, p. 2147-51, 2002.
- PERIDES, G.; LANE, W.S.; ANDREWS, D.; DAHL, D.; BIGNAMI, A. Isolation and partial characterization of a glial hyaluronate-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 10, p. 5981-7, 1989.

- PESHEVA, P.; PROBSTMEIER, R. The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. **Prog. Neurobiol.**, v. 61, p. 465-93, 2000.
- PESHEVA, P.; PROBSTMEIER, R.; SKUBITZ, A.P.N.; MCCARTHY, J.B.; FURCHT, L.T.; SCHACHNER, M. Tenascin R (J1 160/180) inhibits fibronectin-mediated adhesion: functional relatedness to tenascin-C. **J. Cell. Sci.**, v. 107, p. 2323-33, 1994.
- PIJUAN-THOMPSON, V.; GLADSON, C.L. Ligation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ is required for internalization of vitronectin by integrin $\alpha v \beta 3$. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 5, p. 2736-43, 1997.
- PILKINGTON, C.J. The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, n. 9, p. 1159-72, 1996.
- PLANCHENAUT, T.; COSTA, S.; FAGES, C.; RICHE, D.; CHARRIERE-BERTRAND, C.; PERZELOVA, A.; BARLOWATZ-MEIMON, G.; TARDY, M. Differential expression of laminin and fibronectin and of their related metalloproteinases in human glioma cell lines: relation to invasion. **Neurosci. Lett.**, v. 299, n. 1-2, p. 140-4, 2001.
- PLATE, K.H.; BREIER, G.; MILLAUER, B.; ULLRICH, A.; RISAU, W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 53, n. 23, p. 5822-7, 1993.
- PLATE, K.H.; BREIER, G.; WEICH, H.A.; MENNEL, H.D.; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. **Int. J. Cancer**, v. 59, n. 4, p. 520-9, 1994.
- PLATE, K.H.; BREIER, G.; WEICH, H.A.; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. **Nature**, v. 359, p. 845-8, 1992.
- PLATE, K.H.; RISAU, W. Angiogenesis in malignant gliomas. **Glia**, v. 15, p. 339-47, 1995.
- POWELL, S.K.; KLEINMAN, H.K. Neuronal laminins and their cellular receptors. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 29, p. 401-14, 1997.
- PRENZEL, N.; ZWICK, E.; LESERER, M.; ULLRICH, A. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. **Breast Cancer Res.**, v. 2, n. 3, p. 184-90, 2000.
- PREVITALI, S.; QUATTRINI, A.; NEMNI, R.; TRUCI, G.; DUCATI, A.; WRABETZ, L.; CANAL, N. Alpha6 beta4 and alpha6 beta1 integrins in astrocytomas and other CNS tumors. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 55, n. 4, p. 456-65, 1996.
- PREVITALI, S.C.; ARCHELOS, J.J.; HARTUNG, H.P. Modulation of the expression of integrins on glial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. A central role for TNF- α . **Am. J. Pathol.**, v. 151, n. 5, p. 1425-35, 1997.
- PREVITALI, S.C.; QUATTRINI, A.; PARDINI, C.L.; NEMNI, R.; FELTRI, M.L.; BONCINELLI, E.; CANAL, N.; WRABETZ, L. Laminin receptor alpha6beta4 integrin is highly expressed in ENU-induced glioma in rat. **Glia**, v. 26, n. 1, p. 55-63, 1999.
- PRICE, D.J.; MIRALEM, T.; JIANG, S.; STEINBERG, R.; AVRAHAM, H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. **Cell Growth Differ.**, v. 12, p. 129-35, 2001.
- PROBSTMEIER, R.; MICHELS, M.; FRANZ, T.; CHAN, B.M.C.; PESHEVA, P. Tenascin-R interferes with integrin-dependent oligodendrocyte precursor cell adhesion by a ganglioside-mediated signaling mechanism. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, p. 2474-88, 1999.
- QUIGLEY, M.R.; MAROON, J.C. The relationship between survival and the extent of the resection in patients with supratentorial malignant gliomas. **Neurosurgery**, v. 29, p. 385-89, 1991.

- RABSON, A.S.; STERN, R.; TRALKA, T.S.; COSTA, J.; WILCZEK, J. Hexamethylene bisacetamide induces morphologic changes and increased synthesis of procollagen in cell line from glioblastoma multiforme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 74, n. 11, p. 5060-4, 1977.
- RADOTRA, B.; MCCORMICK, D. Glioma invasion in vitro is mediated by CD44-hyaluronan interactions. **J. Pathol.**, v. 181, n. 4, p. 434-8, 1997.
- RÁMON Y CAJAL, S. **Degeneration and regeneration of the central nervous system**, New York: Hafner Publishing, 1928.
- RAMOS, K.L. **Efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados sobre o metabolismo energético e migração de células tumorais**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas I, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- RAMOS, K.L.; COLQUHOUN, A. Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. **Glia**, v. 43, n. 2, p. 149-66, 2003.
- RANUNCOLO, S.M.; LADEDA, V.; SPECTERMAN, S.; VARELA, M.; LASTIRI, J.; MORANDI, A.; MATOS, E.; BAL DE KIER JOFFE, E.; PURICELLI, L.; PALLOTTA, M.G. CD44 expression in human gliomas. **J. Surg. Oncol.**, v. 79, n. 1, p. 30-36, 2002.
- RAZA, S.M.; LANG, F.F.; AGGARWAL, B.B.; FULLER, G.N.; WILDRICK, D.M.; SAWAYA, R. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. **Neurosurgery**, v. 51, p. 2-12, 2002.
- REARDON, D.A.; AKABANI, G.; COLEMAN, R.E.; FRIEDMAN, A.H.; FRIEDMAN, H.S.; HERNDON, J.E 2ND.; COKGOR, I.; MCLENDON, R.E.; PEGRAM, C.N.; PROVENZALE, J.M.; QUINN, J.A.; RICH, J.N.; REGALADO, L.V.; SAMPSON, J.H.; SHAFMAN, T.D.; WIKSTRAND, C.J.; WONG, T.Z.; ZHAO, X.G.; ZALUTSKY, M.R.; BIGNER, D.D. Phase II trial of murine (131I)-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 5, p. 1389-97, 2002.
- REARDON, D.A.; WEN, P.Y. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. **Oncologist**, v. 11, n. 2, p. 152-64, 2006.
- RIDET, J.L.; MALHOTRA, S.K.; PRIVAT, A.; GAGE, F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci.**, v. 20, n. 12, p. 570-577, 1997.
- RITCHIE, C.K.; GIORDANO, A.; KHALILI, K. Integrin involvement in glioblastoma multiforme: possible regulation by NF-kappaB. **J. Cell. Physiol.**, v. 184, n. 2, p. 214-21, 2000.
- ROBERTS, W.G.; PALADE, G.E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 2369-79, 1995.
- ROOPRAI, H.K.; VANMETER, T.; PANOU, C.; SCHNULL, S.; TRILLO-PAZOS, G.; DAVIES, D.; PILKINGTON, G.J. The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 17, n. 5-6, p. 613-23, 1999.
- RUSSEL, D.S.; RUBINSTEIN, L.J. **Pathology of tumours of the nervous system**. London: Williams and Wilkins, 1989, p. 83-350.
- RUTKA, J.T.; APODACA, G.; STERN, R.; ROSENBLUM, M. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. **J. Neurosurg.**, v. 69, n. 2, p. 155-70, 1988.
- RUTKA, J.T.; MURAKAMI, M.; DIRKS, P.B.; HUBBARD, S.L.; BECKER, L.E.; FUKUYAMA, K.; JUNG, S.; TSUGU, A.; MATSUZAWA, K. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. **J. Neurosurg.**, v. 87, p. 420-30, 1997.
- SALERO-COCA, E.; VERGARA, P.; SEGOVIA, J. Intracellular increases of cAMP induce opposite effects in glutamic acid decarboxylase (GAD67) and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in C6 cells. **Neurosci. Lett.**, v. 191, p. 9-12, 1995.

- SANTORO, M.G.; PHILPOTT, G.W.; JAFFE, B.M. Inhibition of tumour growth in vivo and in vitro by prostaglandin E. **Nature**, v. 263, n. 5580, p. 777-9, 1976.
- SAVANI, R.C.; CAO, G.; POOLER, P.M.; ZAMAN, A.; ZHOU, Z.; DELISSER, H.M. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 39, p. 36770-8, 2001.
- SAWAYA, R.E.; YAMAMOTO, M.; GOKASLAN, Z.L.; WANG, S.W.; MOHANAM, S.; FULLER, G.N.; MCCUTCHEON, I.E.; STETLER-STEVENSON, W.G.; NICOLSON, G.L.; RAO, J.S. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 14, n. 1, p. 35-42, 1996.
- SCHACHNER, M.; SCHOONMAKER, G.; HYNES, R.O. Cellular and subcellular localization of LETS protein in the nervous system. **Brain Res.**, v. 158, p. 149-58, 1978.
- SCHMEDTJE, J.F. JR.; JI, Y.S.; LIU, W.L.; DUBOIS, R.N.; RUNGE, M.S. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 601-8, 1997.
- SCHMIDT, N.O.; ZIU, M.; CARRABBA, G.; GIUSSANI, C.; BELLO, L.; SUN, Y.; SCHMIDT, K.; ALBERT, M.; BLACK, P.M.; CARROLL, R.S. Antiangiogenic therapy by local intracerebral microinfusion improves treatment efficiency and survival in an orthotopic human glioblastoma model. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 4, p. 1255-62, 2004.
- SCHVARTZ, I.; SEGER, D.; SHALTIEL, S. Vitronectin. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 31, n. 5, p. 539-44, 1999.
- SEIDENBECHER, C.I.; GUNDELFINGER, E.D.; BOCKERS, T.M.; TROTTER, J.; KREUTZ, M.R. Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, n. 5, p. 1621-30, 1998.
- SEIDENBECHER, C.I.; RICHTER, K.; RAUCH, U.; FASSLER, R.; GARNER, C.C.; GUNDELFINGER, E.D. Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 45, p. 27206-12, 1995.
- SEIFFERT, D. Constitutive and regulated expression of vitronectin. **Histol. Histopathol.**, v. 12, n. 3, p. 787-97, 1997.
- SEIFFERT, D.; CRAIN, K.; WAGNER, N.V.; LOSKUTOFF, D.J. Vitronectin gene expression in vivo. Evidence for extrahepatic synthesis and acute phase regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 31, p. 19836-42, 1994.
- SEIFFERT, D.; IRUELA-ARISPE, M.L.; SAGE, E.H.; LOSKUTOFF, D.J. Distribution of vitronectin mRNA during murine development. **Dev. Dyn.**, v. 203, n. 1, p. 71-9, 1995.
- SEIFFERT, D.; LOSKUTOFF, D.J. Type 1 plasminogen activator inhibitor induces multimerization of plasma vitronectin. A suggested mechanism for the generation of the tissue form of vitronectin in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 47, p. 29644-51, 1996.
- SHONO, T.; TOFILON, P.J.; BRUNER, J.M.; OWOLABI, O.; LANG, F.F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. **Cancer Res.**, v. 61, n. 11, p. 4375-81, 2001.
- SHONO, T.; TOFILON, P.J.; BRUNER, J.M.; OWOLABI, O.; LANG, F.F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. **Cancer Res.**, v. 61, p. 4375-81, 2001.
- SHOSHAN, Y.; NISHIYAMA, A.; CHANG, A.; MÖRK, S.; BARNETT, G.H.; COWELL, J.K.; TRAPP, B.D.; STAUGAITIS, S.M. Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 96, n. 18, p. 10361-6, 1999.
- SIBENALLER, Z.A.; ETAME, A.B.; ALI, M.M.; BARUA, M.; BRAUN, T.A.; CASAVANT, T.L.; RYKEN, T.C. Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. **Neurosurg. Focus**, v. 19, n. 4, p. E1, 2005.

- SOLEM, M.; HELMRICH, A.; COLLODI, P.; BARNES, D. Human and mouse S-protein mRNA detected in northern blot experiments and evidence for the gene encoding S-protein in mammals by Southern blot analysis. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 100, n. 2, p. 141-9, 1991.
- STEINER, H.H.; KARCHER, S.; MUELLER, M.M.; NALBANTIS, E.; KUNZE, S.; HEROLD-MENDE, C. Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. **J. Neurooncol.**, v. 66, p. 129-38, 2004.
- STICHEL, C.C.; MÜLLER, H.W. Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. **J. Neurocytol.**, v. 23, p. 615-30, 1994.
- STICHEL, C.C.; MULLER, H.W. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. **Cell Tissue Res.**, v. 294, n. 1, p. 1-9, 1998.
- STICHEL, C.C.; WUNDERLICH, G.; SCHWAB, M.E.; MÜLLER, H.W. Clearance of myelin constituents and axonal sprouting in the transected postcommissural fornix of the adult rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 7, p. 401-11, 1995.
- STRIK, H.M.; SCHLUESENER, H.J.; SEID, K.; MEYERMANN, R.; DEININGER, M.H. Localization of endostatin in rat and human gliomas. **Cancer**, v. 91, n. 5, p. 1013-9, 2001.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed., New York: WH Freeman and Company, 1996.
- STUPP, R.; HEGI, M.E.; VAN DEN BENT, M.J.; MASON, W.P.; WELLER, M.; MIRIMANOFF, R.O.; CAIRNCROSS, J.G. Changing paradigms-an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. **Oncologist**, v. 11, n. 2, p. 165-80, 2006.
- SWINDLE, C.S.; TRAN, K.T.; JOHNSON, T.D.; BANERJEE, P.; MAYES, A.M.; GRIFFITH, L.; WELLS, A. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. **J. Cell. Biol.**, v. 154, n. 2, p. 459-68, 2001.
- TAGA, T.; SUZUKI, A.; GONZALEZ-GOMEZ, I.; GILLES, F.H.; STINS, M.; SHIMADA, H.; BARSKY, L.; WEINBERG, K.I.; LAUG, W.E. Alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. **Int. J. Cancer**, v. 98, n. 5, p. 690-7, 2002.
- THON, N.; HAAS, C.A.; RAUCH, U.; MERTEN, T.; FASSLER, R.; FROTSCHER, M.; DELLER, T. The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 2547-2558, 2000.
- TIMPL, R.; DZIADEK, M. Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, v. 29, p. 1-112, 1986.
- TODA, M.; MIURA, M.; ASOU, H.; SUGIYAMA, I.; KAWASE, T.; UYEMURA, K. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. **Neurochem. Res.**, v. 24, p. 339-43, 1999.
- TODA, M.; MIURA, M.; ASOU, H.; TOYA, S.; UYEMURA, K. Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by glial fibrillary acidic protein cDNA transfection. **J. Neurochem.**, v. 63, p. 1975-8, 1994.
- TONN, J.C.; WUNDERLICH, S.; KERKAU, S.; KLEIN, C.E.; ROOSEN, K. Invasive behaviour of human gliomas is mediated by interindividually different integrin patterns. **Anticancer Res.**, v. 18, n. 4A, p. 2599-605, 1998.
- TOOLE, B.P.; HASCALL, V.C. Hyaluronan and tumor growth. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 3, p. 745-7, 2002.
- TOTI, P.; VILLANOVA, M.; DE FELICE, C.; MEGHA, T.; BARTOLOMMEI, S.; TOSI, P. Expression of laminin 1 and 2 in brain tumor vessels. An immunohistochemical study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 30, p. 227-30, 1998.
- TREASURYWALA, S.; BERENS, M.E. Migration arrest in glioma cells is dependent on the alphav integrin subunit. **Glia**, v. 24, n. 2, p. 236-43, 1998.

- TSUJII, M.; DUBOIS, R.N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, p. 493-501, 1995.
- TSUJII, M.; KAWANO, S.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 94, n. 7, p. 3336-40, 1997.
- TUNGGAL, P.; SMYTH, N.; PAULSSON, M.; OTT, M.C. Laminins: structure and genetic regulation. **Microsc. Res. Tech.**, v. 51, n. 3, p. 214-27, 2000.
- TURLEY, E.A.; AUSTEN, L.; MOORE, D.; HOARE, K. Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. **Exp. Cell Res.**, v. 207, n. 2, p. 277-82, 1993.
- TURLEY, E.A.; HOSSAIN, M.Z.; SOROKAN, T.; JORDAN, L.M.; NAGY, J.I. Astrocyte and microglial motility in vitro is functionally dependent on the hyaluronan receptor RHAMM. **Glia**, v. 12, n. 1, p. 68-80, 1994.
- TURLEY, E.A.; NOBLE, P.W.; BOURGUIGNON, L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 7, p. 4589-92, 2002.
- TYSNES, B.B.; LARSEN, L.F.; NESS, G.O.; MAHESPARAN, R.; EDVARDSEN, K.; GARCIA-CABRERA, I.; BJERKVIG, R. Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. **Int. J. Cancer**, v. 67, n. 6, p. 777-84, 1996.
- TYSNES, B.B.; MAHESPARAN, R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. **J. Neurooncol.**, v. 53, n. 2, p. 129-47, 2001.
- UHM, J.H.; DOOLEY, N.P.; KYRITSIS, A.P.; RAO, J.S.; GLADSON, C.L. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, n. 6, p. 1587-94, 1999a.
- UHM, J.H.; DOOLEY, N.P.; VILLEMURE, J.G.; YONG, V.W. Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloprotease-2 and protein kinase C. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 14, n. 5, p. 421-33, 1996.
- UHM, J.H.; GLADSON, C.L.; RAO, J.S. The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas. **Front. Biosci.**, v. 4, p. D188-99, 1999b.
- VALTER, M.M.; HUGEL, A.; HUANG, H.J.; CAVENEE, W.K.; WIESTLER, O.D.; PIETSCH, T.; WERNERT, N. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. **Cancer Res.**, v. 59, n. 21, p. 5608-14, 1999.
- VAQUERO, J.; ZURITA, M.; OYA, S. Expression of vascular permeability factor in reactive astrocytes surrounding malignant gliomas. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 28, n. 4, p. 339-41, 2002.
- VIAPIANO, M.S.; MATTHEWS, R.T.; HOCKFIELD, S. A novel membrane-associated glycovariant of BEHAB/brevican is up-regulated during rat brain development and in a rat model of invasive glioma. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 35, p. 33239-47, 2003.
- VILLANOVA, M.; SEWRY, C.; MALANDRINI, A.; TOTI, P.; MUNTONI, F.; MERLINI, L.; TORELLI, S.; TOSI, P.; MARALDI, N.M.; GUAZZI, G.C. Immunolocalization of several laminin chains in the normal human central and peripheral nervous system. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 29, p. 409-13, 1997.
- VITOLO, D.; PARADISO, P.; UCCINI, S.; RUCO, L.P.; BARONI, C.D. Expression of adhesion molecules and extracellular matrix proteins in glioblastomas: relation to angiogenesis and spread. **Histopathology**, v. 28, n. 6, p. 521-8, 1996.
- WAGNER, S.; FUELLER, T.; HUMMEL, V.; RIECKMANN, P.; TONN, J.C. Influence of VEGF-R2 inhibition on MMP secretion and motility of microvascular human cerebral endothelial cells (HCEC). **J. Neurooncol.**, v. 62, n. 3, p. 221-31, 2003.

- WECHSLER-REYA, R.J. Caught in the matrix: how vitronectin controls neuronal differentiation. **Trends Neurosci.**, v. 24, n. 12, p. 680-2, 2001.
- WEGROWSKI, Y.; MAQUART, F.X. Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 49, n. 3, p. 259-68, 2004.
- WEI, Y.; LUKASHEV, M.; SIMON, D.I.; BODARY, S.C.; ROSENBERG, S.; DOYLE, M.V.; CHAPMAN, H.A. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1551-5 1996.
- WEY, J.S.; FAN, F.; GRAY, M.J.; BAUER, T.W.; MCCARTY, M.F.; SOMCIO, R.; LIU, W.; EVANS, D.B.; WU, Y.; HICKLIN, D.J.; ELLIS, L.M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. **Cancer**, v. 104, p. 427-38, 2005.
- WICK, W.; PLATTEN, M.; WELLER, M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. **J. Neurooncol.**, v. 53, n. 2, p. 177-85, 2001.
- WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; SCHWARZBAUER, J.E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **J. Cell Sci.**, v. 116, p. 3269-76, 2003.
- WOODWORTH, A.; PESHEVA, P.; FIETE, D.; BAENZIGER, J.U. Neuronal-specific synthesis and glycosylation of tenascin-R. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 10413-21, 2004.
- WU, Y.; CHEN, L.; CAO, L.; SHENG, W.; YANG, B.B. Overexpression of the C-terminal PG-M/versican domain impairs growth of tumor cells by intervening in the interaction between epidermal growth factor receptor and beta1-integrin. **J. Cell Sci.**, v. 117, n. 11, p. 2227-37, 2004.
- WU, Y.; CHEN, L.; ZHENG, P.S.; YANG, B.B. beta 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 14, p. 12294-301, 2002.
- WU, Y.; ZHANG, Y.; CAO, L.; CHEN, L.; LEE, V.; ZHENG, P.S.; KIANI, C.; ADAMS, M.E.; ANG, L.C.; PAIWAND, F.; YANG, B.B. Identification of the motif in versican G3 domain that plays a dominant-negative effect on astrocytoma cell proliferation through inhibiting versican secretion and binding. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 17, p. 14178-86, 2001.
- YAMAGUCHI, Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 2, p. 276-89, 2000. Review.
- YANG, H.Y.; LIESKA, N.; SHAO, D.; KRIHO, V.; PAPPAS, G.D. Proteins of the intermediate filament cytoskeleton as markers for astrocytes and human astrocytomas. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 21, p. 155-76, 1994.
- YAO, Y.; KUBOTA, T.; SATO, K.; KITAI, R.; TAKEUCHI H.; ARISHIMA, H. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1 in astrocytic tumours. **Acta Neurochir.**, v. 143, p. 159-66, 2001.
- YOSHIDA, J.; WAKABAYASHI, T.; OKAMOTO, S.; KIMURA, S.; WASHIZU, K.; KIYOSAWA, K.; MOKUNO, K. Tenascin in cerebrospinal fluid is a useful biomarker for the diagnosis of brain tumour. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 1212-5, 1994.
- ZADEH, G.; GUHA, A. Angiogenesis in nervous system disorders. **Neurosurgery**, v. 53, p. 1362-74, 2003.
- ZAGZAG, D.; FRIEDLANDER, D.R.; DOSIK, J.; CHIKRAMANE, S.; CHAN, W.; GRECO, M.A.; ALLEN, J.C.; DOROVINI-ZIS, K.; GRUMET, M. Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. **Cancer Res.**, v. 56, n. 1, p. 182-9, 1996.
- ZAGZAG, D.; FRIEDLANDER, D.R.; MILLER, D.C.; DOSIK, J.; CANGIARELLA, J.; KOSTIANOVSKY, M.; COHEN, H.; GRUMET, M.; GRECO, M.A. Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 55, n. 4, p. 907-14, 1995.

ZHANG, H.; KELLY, G.; ZERILLO, C.; JAWORSKI, D.M.; HOCKFIELD, S. Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion In vivo. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 7, p. 2370-6, 1998.

ZHANG, H.; WU, J.; MENG, L.; SHOU, C.C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 8, p. 994-8, 2002.

ZHENG, P.S.; WEN, J.; ANG, L.C.; SHENG, W.; VILORIA-PETIT, A.; WANG, Y.; WU, Y.; KERBEL, R.S.; YANG, B.B. Versican/PD-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. **FASEB J.**, v. 18, n. 6, p. 754-6, 2004.