

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE ASTROCITOMA HUMANO U-87 EM
FIBRONECTINA, LAMININA E COLÁGENO IV E A EXPRESSÃO E ORGANIZAÇÃO DE
VIMENTINA E GFAP**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Nelson H Gabilan

Ricardo Castilho Garcez

Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética – CCB – UFSC

Fevereiro de 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE ASTROCITOMA HUMANO U-87 EM
FIBRONECTINA, LAMININA E COLÁGENO IV E A EXPRESSÃO E ORGANIZAÇÃO DE VIMENTINA E
GFAP**

Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva
Co-Orientador: Prof. Dr. Nelson H Gabilan

Ricardo Castilho Garcez
Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética – CCB – UFSC
Fevereiro de 2004

Gostaria de dedicar este trabalho especialmente aos meus amigos.
Pessoas especiais que podem ser encontradas em cada pedaço deste trabalho e em cada
pedaço de mim.
Pessoas pelas quais grandes sacrifícios valeriam a pena e seriam encarados com muito bom
humor.

O amor só será eterno se estiver junto com a amizade

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Márcio Alvarez Silva, pela constante orientação e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Nelson Gabilan, por aceitar o grande desafio de orientar-me nos momentos iniciais do mestrado, fazendo tudo sempre com muita dedicação e cuidado.

Aos vários orientares que eu tive durante a elaboração deste trabalho, pessoas como Profa. Andréa Trentin, Prof. Nelson Gabilan, Prof. Vivaldo Moura Neto, Prof Rodrigo Leal, Profa. Carla Tasca, Prof Cidônia que sempre estiveram dispostos a esclarecer dúvidas, discutir dados e auxiliar no que foi preciso.

Ao Prof. Paulo Hoffman pela grande ajuda e disponibilidade em momentos turbulentos do mestrado.

Gostaria de deixar um agradecimento especial à “minha pequenininha”, a mulher mais linda do mundo. A vida é cheia de erros e desencontros, mas eu acredito que quando a gente realmente quer algo, a gente consegue. Eu te amo!

Aos meus grandes amigos Marco, Tiago, Claudia e Giordano, pessoas especiais por que daria minha vida.

À galera lá de casa Cristiano e Ferdinando.

Ao Lúcio o cara mais gente boa que eu conheço também (CALLONI, 2003).

Ao animadíssimo grupo do laboratório, Bruno, Carlos, Claudia, Evaldo, Ezequiel, Fabíola, Giordí, Marco, Major Alú e às mais novinhas Meline, Pâmela e Talita pela ajuda no trabalho, na vida... Enfim em tudo.

Às meninas da bioquímica Sheila, Karina, Helena, Tiago e Carla, amigas especiais pelas quais tenho um grande carinho.

À galera das antigas Bruno Lobão, Marcos dos Anjos que apesar de não estarem mais presentes, de uma forma ou de outra têm um dedinho neste trabalho.

Ao Prof. Radovan Borojevic e em especial a Sandra e ao Alex pela atenção e dedicação no ensinamento de técnicas de biologia molecular.

Aos amigos Sandro e Samira pela valiosíssima ajuda nos momentos finais deste trabalho, há poucos dias atrás.

Ao amigo Nivaldo pela ajuda e disponibilidade.

À minha família pelo amor, pela confiança e pelo apoio incondicional sempre, em especial a minha mãe Gilda e a minha irmã Alessandra.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho de mestrado.

À todos que deveriam estar aqui e por erro meu não foram citados, peço que me desculpem!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.2-GLIOMAS.....	01
1.2.1-ASTROCITOMA HUMANO U-87.....	03
1.3- MATRIZ EXTRACELULAR E SUAS INTERAÇÕES COM CÉLULAS TUMORAIS.....	04
1.3.1-FIBRONECTINA.....	07
1.3.2-LAMININA.....	07
1.3.3-COLÁGENO IV.....	10
1.4-FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS.....	11
1.4.1-CLASSIFICAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS.....	13
1.4.2-ALTERAÇÕES PÓS-TRANSCRIPCIONAIS NOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS.....	16
1.4.2.1-VIMENTINA.....	17
1.4.2.1-PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL – GFAP.....	19
2- JUSTIFICATIVA.....	24
3- OBJETIVOS.....	25
3.1- OBJETIVOS GERAIS.....	25
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1- MATERIAIS.....	26
4.2- EQUIPAMENTOS.....	27
4.3- MÉTODOS.....	27
4.3.1- CULTURA DE CÉLULAS.....	27
4.3.2- PREPARO DAS PROTEÍNAS DE MATRIX EXTRACELULAR.....	28
4.3.3- ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	28
4.3.4- ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MÉTODO DO MTT.....	29
4.3.5- ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MÉTODO DO BRdU.....	30
4.3.6- ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – MONOCAMADA.....	30
4.3.7- ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – AGREGADOS.....	31

4.3.8- IMUNOCITOQUÍMICA.....	31
4.3.9- PREPARO DOS EXTRATOS PROTÉICOS.....	32
4.3.10- DOSAGEM DO CONTEÚDO PROTÉICO TOTAL.....	33
4.3.11- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	33
4.3.12- ELETROTRANSFERÊNCIA.....	34
4.3.13- IMUNODETECÇÃO.....	34
4.3.14- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE VIMENTINA E GFAP.....	35
4.3.14.1- EXTRAÇÃO DE RNAs TOTAIS.....	35
4.3.14.2- SÍNTESE DO cDNA.....	36
4.3.14.3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	36
4.3.14.4- PCR SEMIQUANTITATIVO.....	37
4.3.15- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5- RESULTADOS.....	38
5.1- EFEITOS DA FIBRONECTINA, LAMININA E COLÁGENO IV SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DO ASTROCITOMA HUMANO U-87.....	38
5.2- PERFIL DA CINÉTICA DE ADESÃO DE CÉLULAS U-87 SOBRE FIBRONECTINA, LAMININA OU COLÁGENO IV.....	40
5.3- CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS U-87 SOBRE FIBRONECTINA, LAMININA OU COLÁGENO IV.....	40
5.4- MIGRAÇÃO DE CÉLULAS U-87 SOBRE FIBRONECTINA, LAMININA OU COLÁGENO IV.....	42
5.4.1- MIGRAÇÃO A PARTIR DE MONOCAMADAS.....	42
5.4.2- MIGRAÇÃO A PARTIR DE AGREGADOS CELULARES.....	42
5.5- INFLUÊNCIAS DE PROTEÍNAS DA MEC SOBRE A EXPRESSÃO DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS GLIAIS – VIMENTINA E GFAP – EM CÉLULAS U-87.....	46
5.5.1- ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTÉICO DE VIMENTINA E GFAP EM CÉLULAS U-87 CULTIVADAS SOBRE DIFERENTES PROTEÍNAS DA MEC.....	46
5.5.2- ANÁLISE DO CONTEÚDO DE RNAm PARA VIMENTINA E GFAP EM CÉLULAS U-87 CULTIVADAS SOBRE DIFERENTES PROTEÍNAS DA MEC.....	49
5.6- ANÁLISE DAS INFLUÊNCIAS DA FN, LN E DO COL IV SOBRE A ORGANIZAÇÃO DE VIMENTINA E GFAP EM CÉLULAS U-87.....	51
5.6.1- ORGANIZAÇÃO DE VIMENTINA.....	51
5.6.2- ORGANIZAÇÃO DE GFAP.....	53
6- DISCUSSÃO.....	55

7- CONCLUSÕES.....	61
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 01:	Comparação entre classificação e graduação de astrocitomas.....	03
Figura 01:	Modelo estrutural da laminina.....	08
Tabela 02:	Isoformas de laminina.....	09
Figura 02:	Modelo de lâmina basal.....	10
Figura 03:	Classificação e estrutura de filamentos intermediários.....	12
Tabela 03:	Classificação dos filamentos intermediários.....	15
Figura 04:	Regulação da polimerização e despolimerização de GFAP.....	21
Figura 05:	Modelo de interação entre citoesqueleto e matriz extracelular.....	23
Tabela 04:	<i>Primers</i> utilizados.....	36
Figura 06:	Morfologia das células U-87 cultivadas sobre FN, LN ou Col IV.....	39
Figura 07:	Cinética de adesão de células U-87 sobre FN, LN ou Col IV.....	41
Figura 08:	Curva de proliferação de células U-87 sobre FN, LN ou Col IV.....	41
Figura 09:	Migração de células U-87 a partir de monocamadas.....	43
Figura 10:	Migração de células U-87 a partir de agregados celulares.....	44
Figura 11:	Quantificação da migração de célula U-87 sobre FN, LN ou Col IV.....	45
Tabela 05:	Conteúdo de vimentina em células U-87.....	47
Tabela 06:	Conteúdo de GFAP em células U-87.....	47
Figura 12:	Conteúdo de vimentina e GFAP em células U-87.....	48
Tabela 07:	Correlação entre conteúdos de vimentina e GFAP em células U-87.....	49
Figura 13:	Quantificação do RNAm para vimentina e GFAP em células U-87.....	50
Figura 14:	Imunomarcação para vimentina em células U-87.....	52
Figura 15:	Imunomarcação para GFAP em células U-87.....	54

LISTA ABREVIATURAS

01. **BrdU**: bromo-dioxiuridina
02. **BSA**: albumina sérica bovina
03. **cdk**: ciclina
04. **cDNA**: DNA complementar, seqüência exógena de DNA
05. **CK**: citoqueratina
06. **Col IV**: colágeno do tipo IV
07. **DAPI**: brometo de etídeo, di-amino-fenilindol
08. **DMEM**: meio de Eagle modificado por Dulbecco
09. **DO**: densitometria ótica
10. **DTT**: ditioneitol
11. **EDTA**: etileno-dinitrilo-tetracético
12. **EHS**: sarcoma
13. **FI**: filamentos intermediários
14. **FITC**: isotiocianato de fluoresceína
15. **FN**: fibronectina
16. **GAPDH**: gliceraldeído 6 fosfato desidrogenase
17. **GFAP**: proteína ácida fibrilar glial
18. **HEPES**: ácido hidróxi-etil-piperazina-etanosulfônico
19. **IFAP**: proteínas associadas a filamentos intermediários
20. **ISN**: sociedade internacional de neurociências
21. **kDa**: kilo Dalton (1 dalton = a massa aproximada de 1 átomo de hidrogênio)
22. **LN**: laminina
23. **MEC**: matriz extracelular
24. **MMP**: metaloproteinase
25. **MTT**: 2,5 difenil brometo de tetrazólio
26. **NF**: neurofilamento (H, M, L. alto, médio e baixo peso molecular)
27. **OMS**: organização mundial da saúde
28. **PBS**: tampão fosfato salino
29. **PCR**: reação de polimerização em cadeia
30. **PDGF**: fator de crescimento derivado de plaquetas
31. **SDS**: dodecil sulfato de sódio
32. **SFB**: soro fetal bovino
33. **SNC**: sistema nervoso central

RESUMO

O microambiente extracelular é capaz de modular a organização e expressão dos filamentos intermediários (vimentina, GFAP) durante os processos de adesão, proliferação, migração e diferenciação celular. A elucidação destes mecanismos é de relevante importância no estudo da biologia de células normais e tumorais. O presente trabalho visa compreender o envolvimento do microambiente na modulação da expressão e organização de vimentina e GFAP durante a adesão, proliferação e migração celular na linhagem de astrocitoma humano U-87.

Células da linhagem U-87 de astrocitoma humano foram mantidas em DMEM contendo 5% SFB. Os testes de adesão, proliferação e migração foram realizados em placas e cultura revestidas com 20µg/ml de fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV). A expressão de vimentina e GFAP foi determinada por RT-PCR semiquantitativo e os conteúdos protéicos de vimentina e GFAP por Western Blot em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas. Foi observada uma rápida adesão das células U-87 a FN e Col IV, acompanhado por um padrão morfológico composto predominantemente por adesões fibrilares. Sobre LN e controle o padrão de adesão foi do tipo focal, com células aderindo muito lentamente. As matrizes de FN e Col IV foram capazes de estimular proliferação e migração celular, estes fenômenos foram acompanhados de aumento na expressão de vimentina e redução na expressão de GFAP. Sobre a matriz de LN foram observadas baixa proliferação e migração, estes eventos foram associados a discretas modificações na expressão de vimentina e GFAP. A vimentina apresenta-se por todo citoplasma e processos celulares como redes bem definidas, sendo mais densa nas regiões mais distais destes processos. A marcação para GFAP apresenta-se um pouco difusa mais concentrada em regiões onde ocorreriam possíveis pontos de adesão focal.

As variações do ambiente extracelular foram capazes de modular eventos como adesão, proliferação e migração. Esta modulação foi acompanhada por alterações na expressão dos filamentos intermediários de Vimentina e GFAP em células U-87.

ABSTRACT

Cellular events like adhesion, proliferation, migration and differentiation may be modulated by interactions with extracellular matrix proteins (fibronectin, laminin and type IV collagen). These interactions can drive the cellular biology of the intermediate filaments like vimentin, nestin and GFAP, leading at modifications in the cellular behavior. The study of these events and its modulation is helpful in understanding the biology of normal and tumor cells. Human astrocytoma cells U-87 were maintained *in vitro*, in standard culture medium (DMEM + 5% FCS). Cellular adhesion, migration and proliferation were performed in multiwell plates containing 20µg/ml of selected extracellular matrix molecules like fibronectin, laminin and type IV collagen. Vimentin and GFAP expression were measured in this cell lineage by western blot and semiquantitative RT-PCR. The cellular organization of vimentin and GFAP was analyzed by immunocytochemistry. We observed that adhesion and proliferation rate on substrates composed by fibronectin and type IV collagen were increased in relation to the others substrates. The cell morphology on fibronectin and type IV collagen was marked by fibrillary adhesions. However on laminin and controls the morphology was marked by focal adhesions. Using U-87 3D-spheroids and monolayers we observed an increase of migration in substrates formed by fibronectin and type IV collagen. In the other hand, the migration in substrates formed by laminin was reduced. In addition, substrates formed by fibronectin or type IV collagen induced the increase in vimentin expression and decreased in the GFAP expression. These data demonstrate that extracellular matrix proteins are able to modulate cellular events like adhesion, migration and proliferation. This modulation is accompanied by alterations in the expression of intermediate filaments like vimentin.

1 – INTRODUÇÃO

As neoplasias podem ser consideradas como um desequilíbrio patológico nas relações entre célula e tecido (HANAHAN & WEINBERG, 2000). A malignidade é um estado que emerge a partir do microambiente formado pelo tecido tumoral e tecido hospedeiro, onde o tecido hospedeiro participa na introdução, seleção e expansão das células neoplásicas. As células tumorais são capazes de recrutar elementos vasculares para sua nutrição, estimulando, via liberação de citocinas e fatores de crescimento, o tecido hospedeiro a produzir novos vasos (WERNET, 1997). A ativação local do microambiente no tecido hospedeiro (células e elementos da matriz extracelular – MEC) é capaz de alterar o comportamento proliferativo e invasivo das células tumorais (ABOSEIF *et al.*, 1999; VACCARIELLO *et al.*, 1999).

A invasão de células tumorais pode ser vista como um desequilíbrio desta população celular, causando a violação dos limites do tecido normal. A arquitetura do tecido mantida normalmente pela delimitação da membrana basal e comunicações células-célula é capaz de suprimir células de diferentes tipos de tecidos. Esta restrição celular no tecido próprio se dá em virtude das interações entre células recém geradas, células antigas e interações das células com a matriz extracelular (MEC) (LIOTTA & KOHN, 2001). O sucesso de uma célula tumoral maligna pode ser hipotetizado pela resistência a sinais regulatórios emitidos pelo tecido hospedeiro, pois elas são capazes de reservá-los, atribuir outro significado ou simplesmente ignorar estes sinais, proliferando e se disseminando (FIDLER, 1999).

1.2 - GLIOMAS

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) apresentam algumas características distintas dos demais tipos de neoplasias: a) A distinção entre tumor maligno e benigno é pouco evidente no SNC; b) Independente da classificação histológica, eles podem ser altamente malignos, dependendo da sua localização anatômica; c) Eles raramente realizam

metástase fora do SNC, normalmente infiltram pelo parênquima cerebral (CASTRO *et al.*, 2003).

O estudo dos gliomas permitiu observar os diferentes estágios (fenótipos morfológicos por sucessivas mutações genótípicas) entre a célula normal e a célula tumoral. Na prática médica, por serem tumores de crescimento lento, o diagnóstico de gliomas é feito tardiamente, quando o tumor já se encontra numa fase muito avançada e com alto grau de proliferação (HERVÉ-CHNEIWEISS, 1994). Os tumores primários cerebrais, especialmente os gliomas, são extremamente difíceis de serem controlados clinicamente, devido ao seu comportamento altamente invasivo, o que na maioria dos casos, implica na recorrência da patologia (SARIS, 1996). Os pacientes com tumores cerebrais malignos apresentam uma sobrevida média de cerca de três anos (SCHIFFER *et al.*, 1997).

A incidência de neoplasias intracraniais é de 10-20 casos por 100.000, sendo responsáveis por aproximadamente 2% das mortes nos países ocidentais. Em adultos, metade dos tumores são primários e a outra metade são originários de metástases (POBERESKIN & CHADDUCK, 2000). Os tumores primários apresentam uma distribuição dupla, manifestam-se entre crianças de 5 a 9 anos de idade e adultos com mais de 60 anos (SUTHERLAND *et al.*, 1987). Os tumores primários são o segundo tipo de câncer mais comum em crianças até 12 anos (leucemia é o primeiro) e a terceira causa de morte relacionada com câncer em adultos com mais de 34 anos (MCLENDON *et al.*, 1985).

Os gliomas, em particular os de origem astrocitária, são os tumores primários mais comuns, sendo responsáveis por 40% das neoplasias do SNC. Os gliomas derivam a partir de três tipos celulares: astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais, cada um destes apresenta características distintas como incidência, localização e idade preferencial. Além disso, a análise morfológica das células e a utilização de marcadores específicos servem como base para a classificação histopatológica destes tumores.

A classificação dos gliomas adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é a mais utilizada, todavia existem outras classificações, como, por exemplo, a do Instituto St. Anne na França (tabela 01) (KLEIHUES, *et al.*, 1995).

OMS/grau	OMS/nome	St. Anne/nome
I	Astrocitoma pilocítico	Astrocitoma pilocítico
II	Astrocitoma de baixo grau	Astrocitoma grau 1 e 2
III	Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma grau 3
IV	Glioblastoma multiforme	Astrocitoma grau 4

Tabela 01: Comparação entre classificações e graduação de astrocitomas, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Instituto St. Anne – França. Adaptado de KLEIHUES, 1995.

A sobrevivência das células de um glioma esta estreitamente relacionada com a capacidade de adesão à matriz extracelular, proliferação, migração e invasão do tecido adjacente. A composição da matriz extracelular parece ser um fator crítico para determinar o potencial invasivo das células tumorais (CHINTALA *et al.*, 1996). Desse modo, os níveis quantitativos e qualitativos de produção de elementos da matriz extracelular (MEC) pelas células do glioma e a capacidade deste de reconhecer elementos da MEC do tecido normal são fundamentais para determinar sua capacidade de invasão no tecido normal (ZHANG *et al.*, 1998)

1.2.1 – Astrocitoma humano U-87

A linhagem celular de astrocitoma humano U-87 foi isolada a partir de um astrocitoma de grau III (classificação segundo OMS) de uma mulher caucasiana de 44 anos de idade (POTEN & MACINTYRE, 1968). A linhagem U-87 tem se mostrado capaz de formar

tumores altamente invasivos quando inoculada em camundongos atímicos (MARTUZA *et al.*, 1991). Os dados na literatura sobre a expressão vimentina, GFAP e nestina na linhagem U-87 são bastante contraditórios (RUTKA *et al.*, 1999; BELOT *et al.*, 2001). Dados referentes a características como capacidade de adesão, proliferação e migração das células U-87 em diferentes substratos também são bastante controversos (ENAM *et al.*, 1998; RUTKA *et al.*, 1999; BELOT *et al.*, 2001; REMPEL *et al.*, 2001).

1.3- MATRIZ EXTRACELULAR E SUAS INTERAÇÕES COM CÉLULAS TUMORAIS

A matriz extracelular (MEC) determina as propriedades físicas dos tecidos, bem como muitas de suas características. Em alguns casos, a mesma proteína da MEC pode desempenhar diferentes funções, dependendo das vias de sinalização que são ativadas. De maneira geral, a matriz extracelular pode ser definida como um grupo de moléculas de diferentes naturezas que interagem entre si de forma dinâmica e que estão estreitamente relacionadas com a fisiologia celular (BORNSTEIN & SAGE, 2002).

Os efeitos da MEC sobre o comportamento da célula podem ocorrer por dois principais mecanismos: no primeiro ocorre o armazenamento de fatores de crescimento ou proteínas que ligam a fatores de crescimento. Após um armazenamento passivo destes fatores, a MEC pode liberá-los, através do remodelamento enzimático da MEC; no segundo mecanismo, as interações entre célula e MEC podem diretamente regular o comportamento da célula, através da sinalização mediada por receptor, ou por modulação da resposta celular a fatores de crescimento (STREULI *et al.*, 1999). Por exemplo, a ligação de integrinas, a maior classe de receptores de moléculas da MEC, altera profundamente a resposta celular a sinais mitógenos (HOWE *et al.*, 1998; SCHWARTZ & BARON, 1999).

O amplo espectro de receptores para moléculas de MEC possibilita uma diversidade de interações célula-MEC podendo induzir a modulação de um grande número de vias de

transdução de sinais, inclusive àquelas que levam a supressão de apoptose e diferenciação celular (STREULI, 1999).

As células tumorais são abeis em promover remodelamento e alterações na composição da MEC. A MEC que forma a membrana basal é uma barreira para a metástase tumoral, separando as células epiteliais do tecido conjuntivo e do endotélio vascular. O remodelamento ou destruição da membrana basal é necessário para que as células tumorais atinjam o endotélio vascular para migrarem a órgãos distantes. Este comportamento envolve a ativação de uma série de proteinases que atuam sobre a MEC. As metaloproteinases (MMPs) são uma família de endoproteinases dependentes de zinco que atuam diretamente sobre proteínas da MEC (MOSSOVA *et al.*, 1998). A interação de células com laminina-5, por exemplo, promove um fenótipo estático, todavia as MMP-1 e 2, são capazes de clivar a laminina-5 ativando a migração e a invasão. O contato celular com diferentes elementos da MEC é capaz de modular a expressão de diferentes receptores de superfície celular como integrinas e cadherinas, facilitando os processos de invasão tumoral (KATAYAMA *et al.*, 2003).

Nos processos de migração celular, geralmente ocorre a interação das células tumorais com a MEC via integrinas, promovendo a adesão ao substrato e a sinalização necessária para o movimento do citoesqueleto. As células tumorais encontram diferentes MECs durante a migração podendo adaptar-se a estas variações com diferentes receptores e diferentes proteases (ENGBRING & KLEINMAN 2003). Recentemente tem sido demonstrado que o processo de migração nos tecidos, realizado por células tumorais, pode não necessariamente depender de ativação de proteases. Células tumorais deficientes na produção de proteases, ainda assim são capazes de migrarem, apresentando uma morfologia mais amebóide são capazes de se infiltrarem pela estrutura tridimensional do tecido (WOLF *et al.*, 2003).

As células tumorais utilizam-se de elementos da MEC para promover a formação de vasos sanguíneo que irrigarão o tumor. O processo de angiogênese é dependente de uma série de fatores de crescimento e de proteínas da MEC. Os fatores requeridos para a neovascularização são, na maioria das vezes, produzidos pelas células tumorais onde podem permanecer armazenados na MEC. Além disso, está sendo demonstrado que fragmentos de proteínas da MEC são capazes de induzir angiogênese. A laminina-1, por exemplo, pode gerar mais de 20 fragmentos com propriedades angiogênicas, fato semelhante ocorre com a trombospondina e colágenos IV e XVIII (MALINDA *et al.*, 1999; PONCE *et al.*, 1999; ENGBRING & KLEINMAN, 2003).

As moléculas da MEC apresentam uma forte influência sobre a proliferação celular, tanto pelo fato de armazenarem fatores de crescimento, quanto pelas interações diretas. MENDES DE AGUIAR *et al.* (2002) demonstraram que alterações na sulfatação de proteoglicanos são capazes de modificar a expressão de proteínas da MEC como fibronectina e laminina, alterando a capacidade de proliferação de células de glioma de rato C6. O hormônio da tireóide-T3 é capaz de induzir alterações na composição e organização de fibronectina e laminina em astrócitos cerebelares, promovendo modificações nos padrões de adesão, proliferação e diferenciação celular (TRENTIN & MOURA-NETO, 1995; TRENTIN *et al.*, 1995; TRENTIN *et al.*, 2003).

1.3.1- Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína estrutural da MEC, composta por duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto, cada uma com aproximadamente 220 kDa. Esta proteína apresenta domínios específicos para outras proteínas da MEC, para glicosaminoglicanos e para receptores de superfície celular (integrinas). A fibronectina exerce um papel importante na adesão célula-matriz, podendo promover migração celular, em um ciclo de adesão - perda de adesão - adesão celular. Alguns tipos celulares apresentam na MEC alta concentração de fibronectina para orientação migratória durante o desenvolvimento (BOUCAUT *et al.*, 1990). A migração celular ao longo da matriz de fibronectina também está envolvida na recuperação de injúrias (CLARK & BRUGGE, 1995).

ENAM *et al.* (1998) sugerem que a fibronectina tenha um importante papel no processo de invasão nos gliomas. Estes autores afirmam também que a expressão de moléculas da MEC por parte das células neoplásicas pode regular a sua capacidade de invasão. Linhagens de gliomas humanos que apresentam baixa expressão de fibronectina tem uma alta capacidade de migrar em substratos compostos por fibronectina, já células que apresentam alta expressão de fibronectina, apresentam baixa capacidade de migrar sobre este substrato.

1.3.2 – Laminina

A laminina (LN) é uma glicoproteína (850 kDa) com vários domínios que encontra-se organizada em redes nas membranas basais, revestindo epitélios, vasos sanguíneos, nervos e subjacente as meninges. Sintetizada e secretada pelas próprias células do tecido, a laminina interage com receptores de superfície celular, resultando em alterações do comportamento das células, como adesão ao substrato, migração e regeneração (TIMPL & DZIADEK, 1986; BECK *et al.*, 1990).

Isoformas	Localização	Cadeias
Laminina 1	EHS tumor	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$
Laminina 2	Músculo esquelético, cardíaco e nervos	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
Laminina 3	Junções neuromusculares e glomerulos renais	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
Laminina 4	Células de Schwann e músculo esquelético	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
Laminina 5	Junções epidermo-dermais	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$
Laminina 6	Junções epidermo-dermais	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$
Laminina 7	Âmnion humano	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$
Laminina 8	Córion humano	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminina 9	Córion humano	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminina 10	Âmnion humano e cultura de queratinócitos	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$

Tabela 02: Isoformas de lamininas. Adaptado de LUCKENBILL-EDDS, 1997.

As lamininas apresentam efeitos biológicos e funções como adesão, proliferação, migração, diferenciação, crescimento de neuritos e metástase tumoral. Estas funções dependem diretamente da organização molecular da membrana basal (FREIRE & COELHO-SAMPAIO, 2000).

Os gliomas podem modular a expressão de lamina de forma autócrina, produzindo um ambiente extracelular propício para o seu desenvolvimento (GÜNTHER *et al.*, 2003). TYSNES *et al.* (1999) observaram uma alta expressão de laminina nas regiões peri-tumorais em gliomas humanos e em ratos, realizando transplantes heterotópicos observaram que a laminina estava sendo produzida pelos astrócitos reativos do tecido hospedeiro. Estes autores especulam a possibilidade das células tumorais utilizarem-se da laminina produzida pelo tecido hospedeiro para invadir o parênquima cerebral. KOOCHKPOUR *et al.* (1995) observaram que as regiões ricas em laminina nas bordas do tumor após a invasão apresentam muitos fragmentos de laminina, decorrentes da ação de MMPs. Estes fragmentos de laminina poderiam, ainda, apresentar funções biológicas como em processos de neovascularização (ENGBRING & KLEINMAN, 2003).

1.3.3 – Colágeno IV

Os colágenos podem ser expressos com algumas variações estruturais pelas células e desempenham diferentes funções. Podem ser classificados, quanto a sua organização nos tecidos, em fibrilares e não fibrilares, ou com base nas suas diferenças moleculares. Os colágenos do tipo I, II e III, por exemplo, são predominantemente fibrilares. O colágeno do tipo IV (Col IV) é o melhor caracterizado e apresenta-se com aspecto de redes, encontrado, normalmente, como uma placa de material protéico que forma as lâminas basais (figura 02) (EYDEN & TZAPHLIDOU, 2001). Esta proteína forma uma tripla hélice de aproximadamente 400nm de comprimento, formada por duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ (TRUEB *et al.*, 1982). As interações entre as moléculas de colágeno formam uma rede tridimensional que serve como substrato ao qual os outros componentes da MEC são fixados (KHASIGOV *et al.*, 1996).

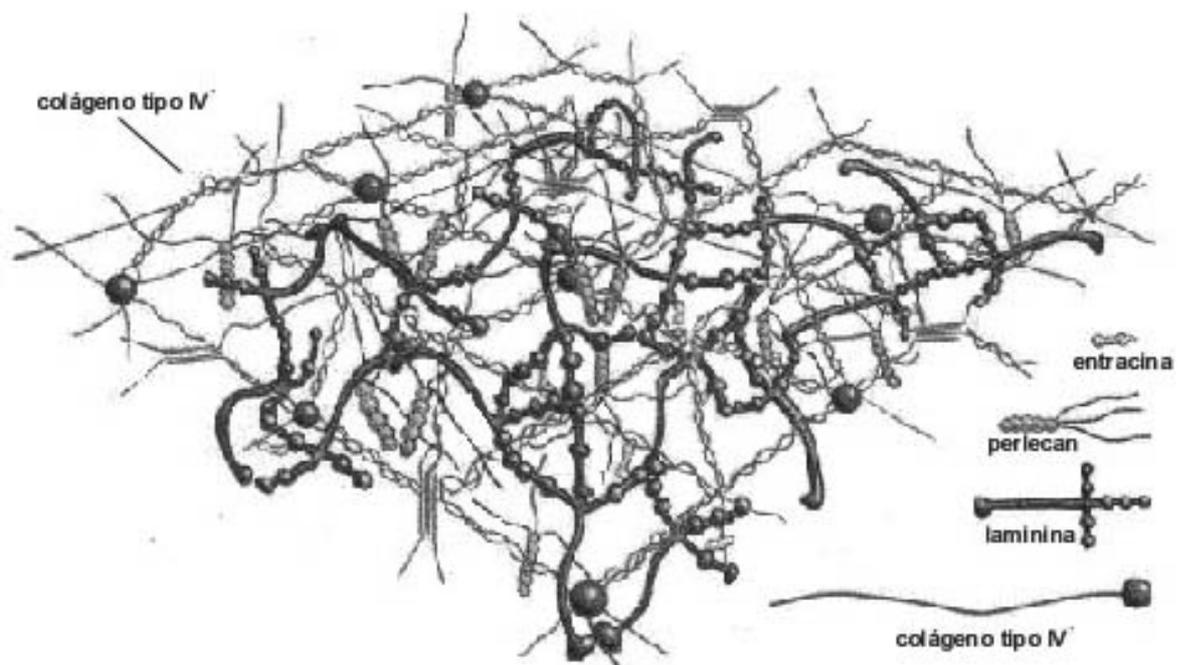


Figura 02: Modelo de lâmina basal, mostrando organização tridimensional do colágeno IV. Adaptado de ALBERTS *et al.* (1997).

O colágeno do tipo IV pode influenciar no controle do ciclo celular, no processo de proliferação ou morte celular em células normais ou em processos patológicos onde ocorre alteração da membrana basal, por exemplo, fragmentos de colágeno IV podem ativar a secreção de collagenases. Este processo é muito comum em células com alta capacidade de migração, proliferação ou diferenciação, como células embrionárias ou células tumorais (EYDEN & TZAPHLIDOU, 2001).

GIESE *et al.* (1998) demonstraram que algumas células de gliomas humanos apresentam uma alta capacidade de adesão ao colágeno IV. Esta proteína, normalmente, encontra-se associada aos vasos sanguíneos no sistema nervoso central, podendo ser encontrada no plexo coróide e epêndima. Neste mesmo estudo, os autores observam intensa migração de células de gliomas associada a estas regiões ricas em colágeno IV.

1.4- FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

As células eucarióticas são estruturadas por um elaborado sistema de interações entre componentes da membrana plasmática com componentes do citoesqueleto (HERMANN & AEBI, 2000). O comportamento dinâmico e a estabilidade mecânica da cito-arquitetura é dependente de um sistema de filamentos interconectados formados pelos microfilamentos constituídos de actina, microtúbulos formados por heterodímeros de α/β -tubulina e por filamentos intermediários (FI) constituídos a partir de proteínas fibrosas codificadas por uma família multigênica de mais de cinquenta membros (FUCHS & WEBER, 1994).

As lâminas nucleares são filamentos intermediários (FI) que formam um revestimento fibroso situado no interior da membrana nuclear, promovendo pontos de ligação para os cromossomos durante a intérfase e participam na formação de complexos multiprotéicos nos poros nucleares (HERMANN & AEBI, 2000).

As proteínas que formam os filamentos intermediários são expressas em tipos celulares específicos, podendo marcar vias do desenvolvimento embrionário através da identificação do grau de diferenciação celular. Frequentemente, filamentos intermediários distintos são co-expressos em um determinado tipo celular num momento específico do desenvolvimento. Esta particularidade serve como base para o diagnóstico e para o estudo da biologia de células tumorais (RUTKA *et al.*, 1997; HERMANN & AEBI, 2000; AKIYAMA *et al.*, 2001).

A actina e a tubulina são proteínas globulares altamente conservadas, com ligação a nucleotídeos e atividade de hidrólise conhecida, já os filamentos intermediários são proteínas fibrosas com uma atividade enzimática pouco conhecida. Eles são caracterizados por uma grande região central em α -hélice, denominada "rod". Esta é uma estrutura bem conservada, mas consideravelmente divergente na sua seqüência primária, exceto por duas regiões altamente conservadas nas regiões finais da α -hélice (figura 03) (FUCHS & WEBER, 1994). Os domínios amino-terminais não pertencentes a região de α -hélice contêm diversos resíduos de aminoácidos básicos que podem realizar interações com os domínios ácidos da α -hélice, bem como formar sítios de ligação com vários componentes celulares, incluindo sítios de fosforilação (INAGAKI *et al.*, 1990; HERMANN & AEBI, 1999).

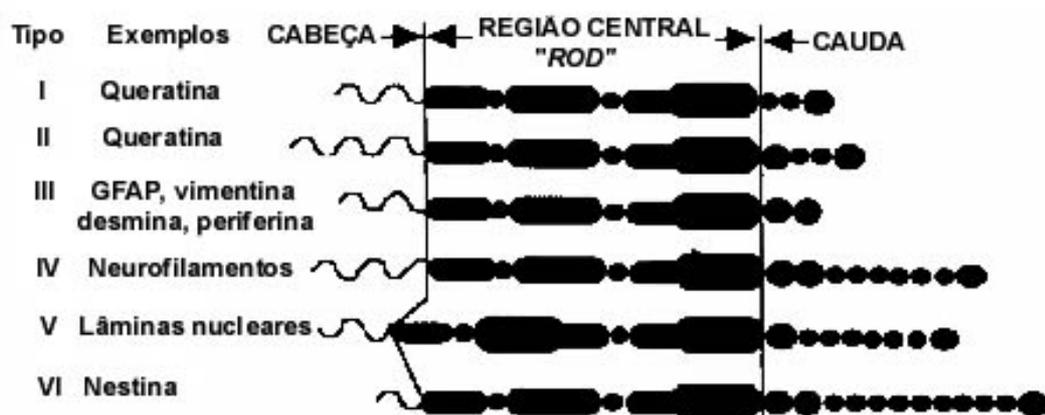


Figura 03: Classificação e estrutura de filamentos intermediários baseada na homologia da seqüência primária. Adaptado de RUTKA *et al.*, 1997.

Existe uma grande diversidade de proteínas de filamentos intermediários, todavia a função exata de cada uma delas ainda é desconhecida. O estudo dos efeitos de mutações nos filamentos intermediário tem elucidado algumas funções em alguns tipos celulares específicos (ELIASSON *et al.* 1999). Tem sido demonstrado que os FIs de queratinas conferem resistência mecânica a pele. Alguns casos de mutações nos genes para as queratinas K1 e K10 têm sido associados a hiperqueratinose epidermolítica (FUCHS & CLEVELAND, 1998). Os neurofilamentos, FIs presentes nos neurônios, participam da modulação do calibre axonal (MARSZALEK *et al.* 1996). A desmina tem sido demonstrada essencial para a manutenção estrutural dos três tipos de músculo (CAPETANAKI *et al.*, 1997). O GFAP (proteína ácida fibrilar glial), FI presente principalmente nos astrócitos, não apresenta sua função completamente conhecida, porém sugere-se que esteja envolvido com a manutenção da citoarquitetura encefálica, formação da barreira hemato-encefálica e modulação de algumas funções neuronais realizadas pelos astrócitos (PEKNY *et al.*, 1998). MENET *et al.* (2001) sugerem que a ausência de GFAP em astrócitos pode modificar diretamente outros componentes do citoesqueleto induzindo alterações bioquímicas em elementos da matriz extracelular e alterando propriedades da membrana plasmática. Estes eventos, quando ocorrem em astrócitos, levam a um aumento na sobrevivência de neurônios e crescimento de neuritos. A vimentina, FI presente nas células mesenquimais, tem sua expressão aumentada em células que apresentaram desdiferenciação dos seus fenótipos, por exemplos, em tumores de mama, leucemias, e astrocitomas com alto grau de anaplasia (RUTKA *et al.*, 1997).

1.4.1- CLASSIFICAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os filamentos intermediários citoplasmáticos são agrupados em quatro classes com base na homologia de suas seqüências (tipo I a IV) (figura 03). As lâminas nucleares formam a classe V. Recentemente foi sugerida a criação de uma classe adicional (classe VI) que

incluiria a nestina, um filamento intermediário identificado primeiramente em células precursoras do sistema nervoso central de mamíferos. Por várias razões, em particular pelo fato da estrutura gênica da nestina permitir a classificação dela com pertencente ao grupo IV, juntamente com os neurofilamentos, os pesquisadores estão preferindo não classificá-la como pertencente a um grupo distinto (SHAW, 1998).

As classes I e II representam as citoqueratinas (CKs); tipo I representa as citoqueratinas ácidas e tipo II as citoqueratinas básicas. Os membros de ambas as classes de citoqueratinas, geralmente precisam de interações entre eles, sendo classe I com classe II e vice-versa, para formar as redes de filamentos (HOFMANN & FRANKE, 1997).

As proteínas de filamentos intermediários das classes III e IV são consideradas como boas formadoras de homopolímeros, todavia o trio de neurofilamentos (NF) pertencentes à classe IV (NF-L, NF-M, NF-H) é um bom exemplo de complexos de filamentos intermediários formado por elementos de um mesmo grupo, onde o NF-M e o NF-H, são incapazes de formar redes homodiméricas, eles precisam interagir com o NF-L (HOFMANN & FRANKE, 1997). Os filamentos intermediários pertencentes às classes III e IV são abeis para formar heteropolímeros entre proteínas da sua classe e de outras classes. A vimentina (classe III) é capaz de se co-polimerizar com desmina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), periferina, NF-L, α -internexina e nestina. As proteínas que formam as lâminas nucleares não se co-polimerizam com proteínas de outras classes (LEUNG *et al.*, 1998; ELIASSON *et al.*, 1999). Com base nestas informações sobre co-polimerizações entre filamentos intermediários, estes podem ser divididos em três grupos distintos (ver tabela 03). A formação de heteropolímeros entre os filamentos intermediários parece ser mais a regra do que a exceção (HERMANN & AEBI, 2000).

Família multigênicas de proteínas de filamentos intermediários

Nome do membro	Classe	Massa em kDa	Ocorrência em Mamíferos
Grupo 1			<i>Citoplasmática</i>
Citoqueratinas ácidas CK9-20	I	40-64	Todas as células epiteliais ; heteropolimerizadas com CK tipo II
Citoqueratinas básicas CK1-8	II	52-68	Todas as células epiteliais ; heteropolimerizadas com CK tipo I
Grupo 2			<i>Citoplasmática</i>
Vimentina	III	55	Células mesenquimais
Desmina	III	53	Células musculares
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	III	50-52	Células glias e células estreladas do fígado
Peripherina	III	54	Diversas células neuronais
Sinemina	III/V	182	Células musculares ; co-polimerizada com desmina e/ou vimentina
Paranemina	IV/I	178	Células musculares ; co-polimerizada com desmina e/ou vimentina
Nestina	III/IV	240	Células tronco neuroepiteliais, células musculares ; co-polimerizada com vimentina e/ou α -internexina
α -internexina	IV	56	Neurônios
Neurofilamentos:	IV		
NF-L		68	Neurônios
NF-M		110	
NF-H		130	Neurônios; co-polimerizado com NF-L Neurônios: co-polimerizado com NF-L
Grupo 3			<i>Nuclear</i>
Lâminas nucleares :	V		
Tipo A/C		62-72	Maioria das células diferenciadas
Tipo B		65-68	Todos os tipos celulares
Elementos sem classificação			<i>Citoplasmática</i>
Phakinina	(I ?)	46	Cristalino ; co-polimerizada com filesina
Filesina	(IV ?)	83	Cristalino ; co-polimerizada com phakinina

Tabela 03: Classificação dos filamentos intermediários. Adaptado de HERMANN & AEBI, 2000.

1.4.2- ALTERAÇÕES PÓS-TRANSCRIPCIONAIS EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

A fosforilação de filamentos intermediários em resíduos de serina e treonina é uma causa comum e efetiva no rearranjo das redes de filamentos encontradas em vários tipos celulares (INAGAKI, 1996). Esta fosforilação pode envolver a modificação de peptídeos em domínios comprometidos com a formação das redes de filamentos intermediários, bem como, com domínios responsáveis por interações com outras proteínas celulares (FENG, 1999). VALGEIRSDÓTTIR (1998), relata que a vimentina pode ser fosforilada no resíduo de tirosina em diferentes condições, todavia ainda não são totalmente conhecidas as conseqüências desta fosforilação diferencial.

A fosforilação de proteínas dos filamentos intermediários é uma via que gera certa quantidade de subunidades solúveis que após defosforilação estão prontas para nova polimerização. Conseqüentemente os processos de fosforilação e defosforilação dos filamentos intermediários são capazes de modular a dinâmica das redes de filamentos intermediários (HERMANN & AEBI, 2000). A subunidade regulatória da proteína fosfatase 2A e a proteína Cinase- α que liga a RhoA têm sido relacionadas com a fosforilação de vimentina *in vitro* e são co-localizadas com os filamentos intermediários de vimentina *in situ* (MATSUZAWA *et al.*, 1998; SIN *et al.*, 1998). Mais especificamente a cinase- α associada a RhoA é co-localizada com vimentina e GFAP nos processos de divisão celular. Evidentemente as cinases são responsáveis pela sintonia fina dos processos biológicos envolvendo os filamentos intermediários (KOSAKO *et al.*, 1999).

Os filamentos intermediários são estruturas altamente polimórficas cuja sua conformação e seu comportamento mecânico podem ser modificados consideravelmente, por exemplo, em resposta a alterações de condições durante o ciclo celular ou por sinais extracelulares (HERMANN & AEBI, 2000).

1.4.2.1 - Vimentina

A vimentina (54 kDa) é o maior componente estrutural dos FIs em células de origem mesenquimal. Esta proteína apresenta-se expressa também nas fases exponenciais de crescimento de células em cultura, independentemente do tipo de FI que estas expressavam *in vivo* (ECKES *et al.*, 1998; VALGEIRSDÓTTIR *et al.*, 1998). As subunidades de vimentina polimerizam-se formando um complexo sistema de redes com uma organização radial estendendo-se de maneira centrífuga ao núcleo. A localização das redes de vimentina é coincidentes com localização das redes de microtúbulos, sugerindo que estes dois sistemas de filamentos interajam entre si (YOON *et al.*, 1998; CLARKE & ALLAN, 2002). O controle dos processos de polimerização e despolimerização de vimentina é realizado por um complexo sistema de cinases e fosfatases (STEINER *et al.*, 1993). Tem sido demonstrado que a vimentina pode ser fosforilada em resíduos de serina e treonina. Além disso, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é capaz de induzir a fosforilação de vimentina em resíduos de tirosina, promovendo despolimerização em determinados segmentos (VALGEIRSDÓTTIR *et al.*, 1998).

Observações da expressão de vimentina, em tipos celulares particulares e em determinados estágios do desenvolvimento, demonstram funções além das tradicionalmente descritas de manutenção da cito-arquitetura celular (ECKES, *et al.*, 1998). Durante o desenvolvimento de camundongos a expressão de vimentina é associada com a mobilidade de células da crista neural (COCHARD & PAULIN, 1984), endoderme parietal (LEHTONEN, *et al.*, 1983) e células mesenquimais (FRANKE *et al.*, 1982). A expressão de vimentina em células pré-diferenciadas durante o desenvolvimento do sistema nervoso e dos músculos sugere que esta proteína possa servir com um sistema precoce de estruturação celular que mais tarde vem a ser substituído por um sistema mais especializado como, por exemplo, a GFAP em astrócitos (COCHARD & PAULIN, 1984) ou desmina em células musculares (FÜRST

et al., 1989). INGBER *et al.* (1994) e MANIOTIS *et al.* (1997) têm sugerido que a distribuição intracelular da vimentina esta relacionada com um sistema de transmissão para sinais mecânicos e bioquímicos.

Mesmo com grande número de trabalhos que tratam da vimentina, seu papel funcional ainda não é bem elucidado. A utilização de anticorpos neutralizante para vimentina em linhagem de fibroblastos embrionários 3T3 não induz nenhum grande efeito na morfologia e na fisiologia celular (KLYMKOWSKY, 1981). A super expressão de vimentina em camundongos leva a uma diferenciação aberrante do cristalino (CAPETANAKI *et al.*, 1989), porém este mesmo efeito é observado com a super expressão de outros sistemas de FIs (MONTEIRO *et al.*, 1990). COLUCCI-GUYON *et al.* (1994), utilizando um sistema de inativação do gene para a vimentina em camundongos, não observaram nenhuma grande alteração no que diz respeito ao desenvolvimento e a funções distintas nos tecidos e órgãos. Em adição a estes dados, HOLWELL *et al.* (1997) relatam que a vimentina não apresenta função no crescimento, mobilidade celular e na resistência a injúrias mecânicas.

Todavia estudos mais detalhados têm demonstrado alterações morfo-funcionais relacionadas a vimentina. Evidências de um fenótipo anormal causado pela inativação do gene para a vimentina foram observadas em astrócitos. A falta da vimentina nestas células impediu a formação e a organização das redes de GFAP que são recuperadas após transfecção das células com cDNA para vimentina (GALOU *et al.*, 1996). ELIASSON *et al.* (1999) observaram que a polimerização normal da GFAP em astrócitos é dependente da presença da vimentina. Em situações anormais onde o gene para vimentina é inativado, a polimerização da GFAP ocorre, porém de maneira anormal, os feixes de FI formados são mais densos e os espaços entre eles são maiores, conferindo a estas células uma maior rigidez. A polimerização e a formação de redes normais de vimentina também é dependente da presença da vimentina (LEUNG *et al.*, 1998; ELIASSON *et al.* 1999). A inativação do gene para vimentina

também demonstrou promover alterações na recuperação de injúria neuronais (PEKNY *et al.*, 1999) e alterações em processos glicolipídicos (GILARD *et al.*, 1998). ECKES *et al.* (1998) contrariando os dados publicados por HOLWELL *et al.* (1997) descreveram que a vimentina esta diretamente relacionada com a estabilidade mecânica, mobilidade e força contrátil em fibroblastos. GAO & SZTUL (2001) observaram que as membranas que formam as cisternas do Complexo de Golgi realizam interações funcionais com as redes de vimentina. Existem vários trabalhos que relatam a importância da vimentina em células tumorais, em processos de adesão, migração e invasão (RUTKA & SMITH, 1993; HENDRIX *et al.*, 1997; RUTKA *et al.*, 1997; SCHIFFER *et al.*, 1997; EBERT *et al.*, 2000; EBERT *et al.*, 2001; KÁLMÁN & AJTAI, 2001), todavia os mecanismos exatos pelos quais a vimentina pode contribuir para o aumento da malignidade de um tumor não são claros.

Mesmo com o grande número de estudos envolvendo a vimentina, ainda não é totalmente esclarecida a função desta proteína. Da mesma forma que pesquisadores observam células e até mesmo organismos normais apesar de não expressarem vimentina, outros trabalhos evidenciam que as funções da vimentina são bastante particulares e podem variar com o tipo celular envolvido, com o grau de diferenciação, condições de estresse e situações patológicas como o câncer.

1.4.2.2- Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

A proteína ácida fibrilar glial-GFAP (50kDa) apresenta conformação filamentosa formada por um domínio central em α -hélice, ou também conhecido como domínio *rod*. As regiões amino e carboxi-terminais são extremamente variáveis entre os diferentes FIs, na GFAP, a região amino-terminal é onde encontra-se os sítios de fosforilação e interações com outras moléculas. A quantidade de GFAP solúvel é muito pequena, normalmente ela encontra-se polimerizada formando complexas redes insolúveis, como os demais membros

dos FIs (RUTKA *et al.*, 1997; HERMANN & AEBI, 2000). Apesar da GFAP ser considerado um marcador de células de origem astrocitária, ela pode ser encontrada em oligodendrogliomas, ependimomas, tumores neuroectodermiais primitivos e papilomas do plexo coróide (COFFIN *et al.*, 1983; NAKAGAWA *et al.*, 1986; KLEIHUES *et al.*, 1987), além disso a GFAP pode ser encontrada fora do sistema nervoso, como no cristalino, glândulas salivares e seus derivados neoplásicos (RUSSELL & RUBINSTEIN, 1989).

A GFAP foi inicialmente isolada da substância branca de paciente portadores de esclerose múltipla (ENG *et al.*, 1971). Esta doença é caracterizada por uma progressiva desmielinização no sistema nervoso central, seguida de intensa ativação de astrócitos (gliose reativa). O objetivo destes pesquisadores era de isolar proteínas insolúveis presentes do sistema nervoso *pos mortem* de paciente acometidos por esclerose múltipla. Estes resultados foram apresentados por Lawrence F. Eng no 2º ISN em Milão no dia 09 de março de 1969. Seis meses depois, no dia 3 de setembro, Eric Shooter apresentou a seqüência de aminoácidos da GFAP, no 2º Encontro Internacional da Sociedade Internacional de Neuroquímica, também em Milão (ENG *et al.*, 2000).

BONGCAM-RUDLOFF *et al.* (1991) localizaram o gene codificante para GFAP no cromossomo 17, na região 17q21. Este gene é ativado por um promotor que se liga a uma seqüência TAT 29pb antes do início do gene (NAKATAMI *et al.*, 1990). Proteínas com Sp-1, NF-1, AP-1 e AP-2, são capazes de ligarem-se ao promotor da GFAP ativando sua transcrição. Um bom exemplo pode ser demonstrado pela liberação de interleucinas (ILs) no sistema nervoso em processos inflamatórios após lesão. As ILs ativam a expressão de *c-jun* e *c-fos*, estes por sua vez são capazes de ligarem-se a AP-1 aumentando a expressão da GFAP (LAPING *et al.*, 1994).

Da mesma forma como ocorre em outros FIs, a GFAP não existe em uma forma estática, há uma constante alteração da polimerização e conseqüente modificação do padrão

filamentoso. A fosforilação da região amino-terminal da GFAP promove a solubilização desta molécula, já o passo contrário, a defosforilação leva a formação de polímeros insolúveis (redes de GFAP) (INAGAKI *et al.*, 1994) (figura 04). A polimerização correta da GFAP é dependente da presença de outro FI, a vimentina, a ausência deste resulta na formação redes de FI mais densas e compactas (ELIASSON *et al.*, 1999).

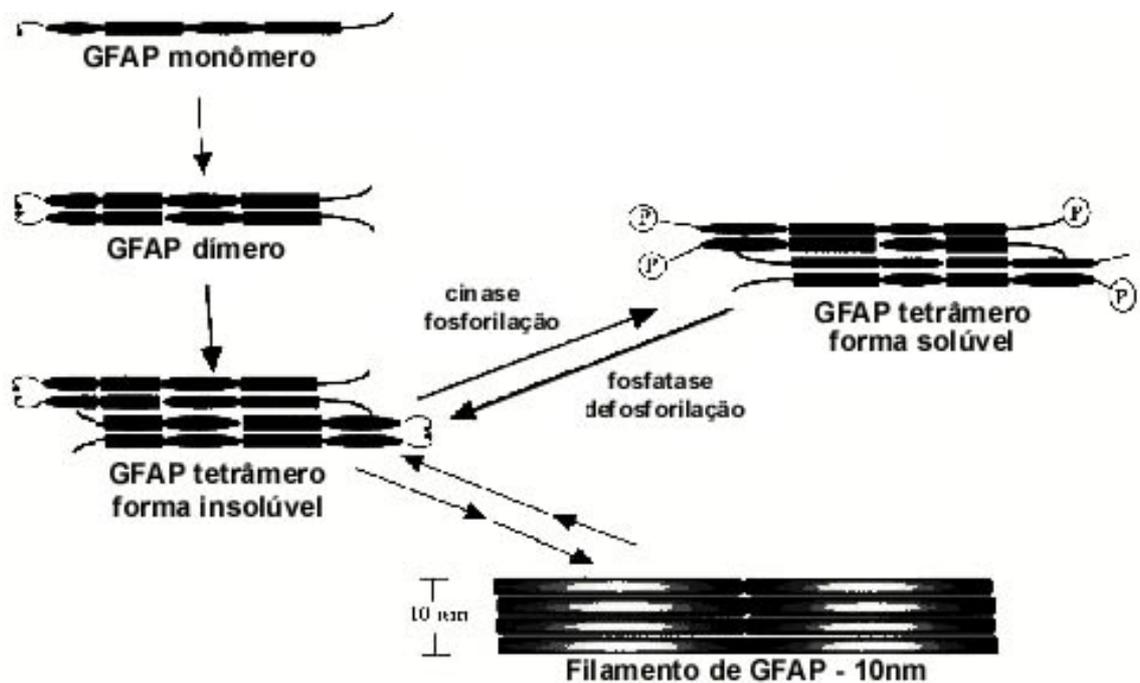


Figura 04: Regulação da polimerização e despolimerização de GFAP. Duas moléculas de GFAP se unem formando um dímero. Dois dímeros são capazes de unir-se num sentido antiparalelo formando um tetrâmero. Após defosforilação estes tetrâmeros podem unir-se formando os típicos feixes insolúveis de GFAP. Adaptado de RUTKA *et al.*, 1997.

A fosforilação da GFAP é realizada no domínio amino-terminal em resíduos de serina e treonina. Esta fosforilação pode ser mediada por proteínas cinases dependente de ciclinas (cdk1 e cdk2), proteínas cinases dependente de AMPc, cinases II dependentes de Ca^{+2} e calmodulina e proteína cinase C. Estas diferentes cinases são capazes de fosforilar diferentes sítios, levando a uma série de respostas distintas importantes no controle dos processos de polimerização e despolimerização da GFAP. Uma série de fosfatases são responsáveis pela

defosforilação da GFAP, mantendo-se assim o comportamento dinâmico desta proteína (INAGAKI *et al.*, 1994).

Apesar do grande número de informações que se tem sobre a GFAP, ainda é pouco conhecido a sua função nos astrócitos e tumores de origem astrocitária. De maneira geral, a GFAP é descrita como sendo responsável pela estabilização do citoesqueleto, mantendo a forma da célula, todavia nem mesmo estas funções se sabem exatamente como ocorrem e como são reguladas (HERMANN & AEBI, 2000).

As interações físicas dos FIs com as lâminas nucleares, membrana plasmática ou mesmo organelas, comumente é intermediada por proteínas associadas a filamentos intermediários (IFAPs), porém os detalhes destas interações não foram totalmente caracterizado (ERRANTE *et al.*, 1994). Um exemplo de IFAP que interage com GFAP é a plectina, uma proteína de 300kDa que foi inicialmente identificada em células C6, uma linhagem de glioma de rato (PYTELA & WICHE 1980). A plectina é capaz de ligar-se a diversos FIs e é co-localizada com filamentos de actina nas fibras de estresse. Praticamente em todos os tipos celulares pode ser encontrado plectina (SEIFERT *et al.*, 1992). A plectina medeia a interação de sistemas de FIs com a actina e suas proteínas associadas, como talina, vinculina actinina. Este complexo mecanismo de interação entre elementos do citoesqueleto é capaz de interagir com integrinas, conectando, desta forma, o citoesqueleto ao meio extracelular (figura 05) (RUTKA *et al.*, 1997; WICHE, 1998).

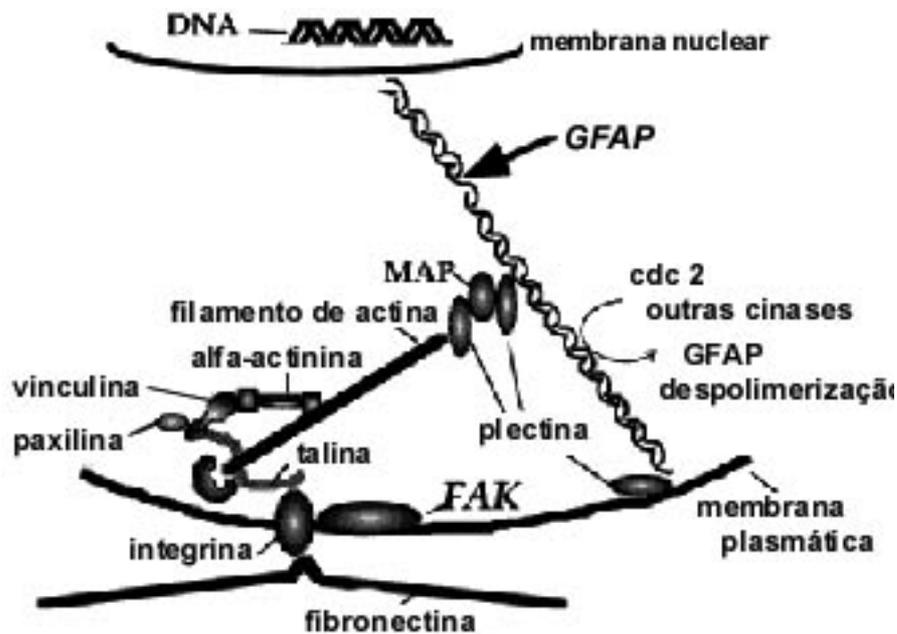


Figura 05: Modelo de interação entre citoesqueleto e matriz extracelular. Esta imagem mostra que a interação entre GFAP e membrana plasmática pode ser realizada diretamente via plectina, ou passando por um complexo molecular de proteínas associadas a filamentos intermediários (IFAPs). Adaptado de RUTKA *et al.*, 1997.

Existem evidências que a GFAP é capaz de regular fenômenos extracelulares como, por exemplo, o crescimento de neuritos. GIMÉNEZ Y RIBOTTA *et al.* (1995) demonstraram que o bloqueio farmacológico da expressão de GFAP na medula espinhal após lesão é capaz de reduzir a gliose reativa, permitindo regeneração axonal. A não expressão da GFAP em co-culturas de astrócitos e neurônios também demonstrou favorecer o crescimento de neuritos, o mesmo não ocorreu com outros sistemas de FIs como a vimentina (MENET *et al.*, 2001). Estes autores também demonstraram que este favorecimento no desenvolvimento de neuritos esta relacionada com a expressão de elementos da matriz extracelular e moléculas de adesão como, fibronectina, laminina, sulfato de condroitina, N-caderinas e N-CAM.

2 - JUSTIFICATIVA

Os filamentos intermediários gliais são proteínas que vêm sendo relacionadas com uma série de eventos celulares como proliferação, migração, invasão e diferenciação. Existe um grande número de trabalhos que descrevem a existência de determinados filamentos intermediários associados a características celulares específicas e a situações patológicas, levando a algumas associações entre filamentos intermediários e fenômenos observados. Principalmente no que diz respeito ao estudo de células tumorais, muitos dos fenômenos associados à presença de filamentos intermediários, são também associados a elementos da matriz extracelular. São exaustivos os dados existentes na literatura que descrevem as influências de proteínas da matriz extracelular sobre os diferentes tipos celulares, incluindo células tumorais. Entretanto é muito pequeno o número de trabalhos que fazem uma associação entre fenótipo celular, matriz extracelular e filamentos intermediários. Além disso, os poucos dados existentes são resultados de observações estáticas que acabam fornecendo poucos dados sobre a biologia destes processos. Este trabalho busca apresentar uma humilde colaboração para a compreensão da biologia de filamentos intermediários (vimentina e GFAP) e as suas relações com proteínas da matriz extracelular como fibronectina, laminina e colágeno IV e comportamento celular.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivos gerais

- Estudar a influência de proteínas da matriz extracelular sobre a adesão, proliferação, migração celular e sobre a expressão e organização de filamentos intermediários em células de astrocitoma humano U-87.

3.2 - Objetivos específicos

- Estudar os processos de adesão, proliferação e migração de células de astrocitoma humano U-87 sobre fibronectina, laminina ou colágeno IV;
- Verificar a influência da fibronectina, laminina e colágeno IV sobre a expressão de vimentina e GFAP;
- Avaliar a organização da vimentina e GFAP em células U-87 crescidas na presença de fibronectina, laminina, ou colágeno IV.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

Ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e metanol, REAGEN.

Ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), Ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfônico (HEPES), acrilamida, albumina sérica bovina (BSA), anticorpo anti-peroxidase, anticorpo policlonal anti-GFAP, anticorpo policlonal anti-laminina, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (FITC e TriTC), anticorpo secundário anti-IgG de coelho (FITC e TriTC), azul de coomassie R-250, brometo de etídeo, di-amino-fenilindol (DAPI), glicerol, n-propil-galacto-glicerol, soro normal de cabra, e tripsina, SIGMA, St Louis.

Anticorpo monoclonal anti-vimentina e anticorpo policlonal anti-fibronectina, DAKO, Carpinteria, CA.

Agarose ultra pura, Aprotinina, Benzamidina, Bis-acrilamida, Cloreto de Potássio, Cloreto de Sódio, ditioneítról (DTT), Fosfato de Potássio, Fosfato de Sódio Dibásico, Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Padrão de Peso Molecular, Persulfato de Amônia, PMSF, Soro Bovino Fetal (SBF) e TEMED, GIBCO.

Dodecil sulfato de sódio (SDS), kit para quimioluminescência (ECL), membranas de nitrocelulose, padrões de peso molecular, película Hyperfilm, Taq DNA polimerase, ThermoScript RT-PCR System, Tris, TRIzol e Tween, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH.

Glicose e Peróxido de Hidrogênio, MERCK.

Paraformaldeído, VETEC, Rio de Janeiro.

Soluções Fixadora e Reveladora, KODAK.

3.2 – EQUIPAMENTOS

Agitador magnético - QUIMIS Q-221-2; Banho Maria, dbm 120 - BENFER ; Balança Analítica - AB 204 - METTLER TOLEDO; Centrífuga, CONTINENTAL – VI; Centrífuga, EPPENDORF - 5415 D; Câmara de Neubauer - HIRSCHMANN TECHCOLOR; Sistema de Eletroforese e Eletrotransferência HOEFER *mini VE* - AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH; Espectrofotômetro Ultrospec 3000 - PHARMACIA BIOTECH; Estufa úmida de CO₂ – NUAIRE; Fluxo laminar – VECO; Microcentrífuga - 5415 D – EPPENDORF; Microscópio epifluorescente – OLYMPUS; Microscópio óptico – OLYMPUS; pHmetro - TM 38 - SENSORTECHNIK MEINSBERG GMBH; Scanner – UL 1950, LOGITECH ;

3.3 – MÉTODOS

3.3.1 - CULTURA DE CÉLULAS

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de astrocitoma humano U-87 doada pelo Dr. Guido Lenz, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRG, Porto Alegre, RS). Esta linhagem foi originalmente obtida a partir de um astrocitoma de grau III (OMS) de uma mulher caucasiana de 44 anos (POTEN & MACINTYRE, 1968). A linhagem U-87 foi mantida estéril cultivadas em garrafas de cultura de 25cm² contendo meio de cultura Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). As células foram manipuladas em capela de fluxo laminar e mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂ a 37°C. Após a confluência, as células foram retiradas com solução de tripsina (tripsina 0,125%, EDTA 0,5mM, em tampão fosfato salino [PBS], pH 7,4) ou com uma solução de PBS pH 7,4 com 2mM de EDTA a temperatura ambiente. A reação foi neutralizada pela adição de meio de cultura contendo 5% de SFB. Após lavagens com PBS, as células foram plaqueadas a uma densidade de 10⁶ células em cada garrafas de cultura de 25 cm². O soro fetal bovino (SFB) foi utilizado somente durante a fase de

expansão das células. Os experimentos foram realizados em meio DMEN sem suplementação de SFB.

3.3.2 – PREPARO DAS PROTEÍNAS DE MATRIX EXTRACELULAR

Proteínas constituintes da matriz extracelular (MEC) como fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno tipo IV (Col IV) foram adquiridas comercialmente e diluídas a uma concentração de 20µg/ml. A fibronectina e o colágeno tipo IV foram diluídos em PBS pH 7,4. A laminina foi diluída em tampão acetato pH 4,0 acrescido de 2mM de CaCl₂ a uma concentração de 20µg/ml (CHENG, *et al.*, 1997; FREIRE & COELHO-SAMPAIO, 2000). As concentrações de proteínas da MEC e os diluentes utilizados foram pré-definidos utilizando ensaios de adesão, proliferação e imunofluorescência (dados não demonstrados). Após a aplicação das determinadas soluções nas placas de cultura, estas foram mantidas a 4°C por 12 horas. Após este período o sobrenadante é removido, as placas são lavadas com PBS e as células plaqueadas de forma adequada a cada experimento. Como controle foi utilizada a ausência de quaisquer moléculas da MEC – plástico.

3.3.3 – ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

A capacidade de adesão das células do astrocitoma U-87 às diferentes moléculas da MEC foi testada utilizando o método do MTT descrito por MOSSMANN (1983). As células foram descoladas das garrafas de cultura utilizando uma solução de PBS com 2mM de EDTA, em seguida, foram plaqueadas a uma densidade de 10⁴ células/cm² em placas de 96 poços previamente revestidas com FN, LN ou Col IV. As células foram mantidas em condições de cultivo em intervalos de 3hs, 6hs, 12hs e 24hs. Ao final de cada tempo, os poços foram lavados com PBS para remoção das células não aderentes, em seguida foi adicionado 10µl/poço de 2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT, 5mg/ml) e a placa incubada

por 4 horas nas condições de cultivo. Nas células viáveis, as desidrogenases mitocondriais reduzem o MTT, produzindo um precipitado colorido que foi dissolvido pela adição de SDS a 10% durante 12 horas, a 37°C. A coloração foi quantificada por leitura da absorbância a 540nm. Os valores de absorbância são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis aderidas.

3.3.4 – ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MÉTODO DO MTT

A influência das moléculas de MEC sobre a proliferação do astrocitoma U-87 foi testada pelo método do MTT e pelo método do BrdU (descrito a seguir). Nos experimentos realizados com o MTT foram utilizadas duas formas de controle. A primeira, utilizada também em praticamente todos os experimentos, consiste na célula cultivada sobre uma superfície desprovida de moléculas da MEC (plástico); a segunda foi realizada com o objetivo de assegurar que as medidas realizadas eram realmente de proliferação celular. Para isto, em um grupo foram realizadas leituras poucos minutos após o plaqueamento das células sobre as moléculas de MEC, tendo desta forma um valor correspondente ao número inicial de células utilizadas no experimento. Este dado possibilita a identificação de morte celular nos demais grupos.

Para estes ensaios foram utilizadas placas de 96 poços previamente incubados com proteínas de MEC. As células U-87 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^3 células/cm² e incubadas em intervalos de 24hs, 48hs, 72hs e 96hs nas condições de cultivo. A cada 24hs 15% do meio de cultura era substituído por meio novo. Ao final de cada tempo, foram adicionados 10µl/poço de 2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT, 5mg/ml) e a placa incubada por 4 horas nas condições de cultivo. Em seguida foi adicionado SDS a 10% durante 12 horas, a 37°C. A coloração foi quantificada por leitura da absorbância a 540nm (MOSSMANN, 1983).

3.3.5 – ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MÉTODO DO BRdU

A proliferação celular foi analisada, também pela incorporação com 5-bromo-2'-deoxiurina (BrdU), que corresponde a um análogo da timidina incorporando-se ao DNA das células que estão proliferando. As células U-87 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^3 células/cm² e incubadas com 1µg/ml BrdU em intervalos de 24hs, 48hs, 72hs e 96hs nas condições de cultivo. A cada 24hs 15% do meio de cultura era substituído por meio novo. Ao final de cada tempo as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 20 min. As culturas foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas em HCl 2N a 50°C por 15 min. (duas vezes). A seguir as células foram lavadas duas vezes, com tampão borato 0,1M durante 10 min a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-BrdU e conjugado peroxidase. A revelação foi realizada com DAB e as células totais foram visualizadas em microscópio de contraste de fase. O índice mitótico foi calculado contando-se a porcentagem de células marcadas em pelo menos cinco diferentes campos por lâmina (TRENTIN *et al.*, 1995).

3.3.6 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – MONOCAMADA

Os diferentes padrões de migração de células U-87, sobre FN, LN ou Col IV foram determinados utilizando células cultivadas em monocamadas.

As células U-87 foram semeadas em placas de 4 poços contendo lamínulas de 0,25 cm² a uma densidade de 10^5 células/poço. Após 48 horas, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro e mantido em condições de cultivo por mais 2 horas. As lamínulas foram, então, removidas cuidadosamente e colocadas em placas de 4 poços pré-revestidas com FN, LN ou Col IV. As placas foram mantidas em condições de cultura e as células fotografadas após 8 horas. O padrão de migração foi diretamente proporcional ao

número de células além dos limites da lamínula. Utilizando o método do BrdU (item 3.3.5) não foi observado proliferação destas células durante o ensaio.

3.3.7 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – AGREGADOS

As células do astrocitoma U-87 após confluência formam, espontaneamente, agregados celulares. A capacidade de migração das células destes agregados foi testada colocando-os em placas de cultura previamente revestidas com FN, LN ou Col IV. Após um período de 24 horas estes agregados foram fotografados e as células que migraram foram quantificadas através da medida do alo de migração formado. Para esta medida, a imagem foi dividida em 8 planos de 45° cada, o ponto de origem foi determinado aleatoriamente. Foi considerado como limite máximo de migração a região mais afastada possível do agregado que continha 5 ou mais células num intervalo de 45°. Foi considerado como valor numérico para a migração a média dos limites máximos dos oito intervalos. Utilizando o método do BrdU (item 3.3.5) foi verificado uma proliferação inferior a 1,9% ($\pm 0,98\%$) destas células durante o ensaio.

3.3.8 - IMUNOCITOQUÍMICA

Os ensaios imunocitoquímicos foram realizados para análise da organização de moléculas de MEC (fibronectina, laminina e colágeno tipo IV) e de filamentos intermediários (vimentina, proteína ácida fibrilar glial - GFAP). A organização das moléculas de MEC foi avaliada na condição controle (dados não apresentados). A organização da vimentina e de GFAP foi analisada após 24 e 96 horas de cultivo das células sobre FN, LN ou Col IV. Em ambas as situações, as monocamadas de células foram fixadas com paraformaldeído a 4 % durante 20 minutos e a seguir lavadas uma vez com PBS-Triton (0,3 %) e duas vezes com

PBS (pH 7,4), à temperatura ambiente. Os sítios não-específicos foram bloqueados com 5% de soro normal de cabra em PBS durante 1 hora. As células foram então lavadas com PBS e incubadas, por 12 horas, com os anticorpos correspondentes preparados em PBS, a 4°C em câmara úmida, como segue: anticorpo policlonal anti-fibronectina 1:300; anticorpo policlonal anti-laminina 1:300; anticorpo policlonal anti-colágeno IV 1:300; anticorpo monoclonal anti-vimentina 1:100; anticorpo policlonal anti-GFAP 1:200. Após nova lavagem com PBS, as células que haviam sido incubadas com anticorpos policlonais foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado à rodamina (TriTC)1:5000 ou anti-IgG de coelho conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC)1:200 diluídos em PBS. As células que haviam sido incubadas com anticorpos monoclonais foram submetidas à incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1:200, diluído em PBS. A incubação secundária foi realizada por 1 hora, em todos os casos. As células foram lavadas com PBS e mantidas por 30 segundos no marcador de núcleo DAPI. As lâminas foram montadas com n-propil-galacto-glicerol, observadas e fotografadas em microscópio epifluorescente. Foram analisados oito campos aleatórios em cada lâmina.

3.3.9 – PREPARO DOS EXTRATOS PROTÉICOS

As células U-87 foram plaqueadas em poços revestidos com FN, LN ou Col IV (20µg/ml) a uma densidade de 10^4 células/cm² e mantidas em condições de cultivo por 24hs, 48hs, 72hs ou 96hs. A cada 24hs 15% do meio de cultura era substituído por meio novo. No final de cada período o meio era removido, as células lavadas com PBS e homogeneizadas em tampão de extração (50 mM de Tris, 2 mM de EDTA, 2 µg/ml de Aprotinina, 2 mM de Benzamidina, 0,1 mM de PMSF, pH 7,0) numa proporção de 150µl de tampão de extração para 10cm² de monocamadas celulares.

Alíquotas de 5 µl foram recolhidas para determinação do conteúdo protéico total e o restante foi imediatamente homogeneizado em tampão de eletroforese (v/v) de 1/5 (concentração final - 4% de SDS; 50 mM de Tris; 100 mM de EDTA; 8% de β-mercaptoetanol; 40% de glicerol; Azul de Bromofenol; pH 6,8) e aquecido por 4 minutos a 98°C. Estas amostras prontas para serem submetidas à eletroforese apresentavam uma concentração final de proteína que variava de 2-5 µg/µl.

3.3.10 - DOSAGEM DO CONTEÚDO PROTÉICO TOTAL

Para quantificar o conteúdo protéico de extratos totais provenientes das células U-87 cultivadas sobre FN, LN ou Col IV foi utilizado o método de BRADFORD (1976). As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (λ 595nm) e comparadas a uma curva padrão elaborada com albumina sérica bovina (2-20 µg/ml).

3.3.11 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os géis foram preparados em placas de vidro de minigel (10,5 X 12 cm), na espessura de 1 mm, contendo 10 poços e apresentavam a seguinte composição: gel de separação: 10% Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1; w/w), 375 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED, 0,1% de persulfato de amônia, pH 8,8; gel de entrada: 4% de Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1 w/w), 125 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED, 0,1% de persulfato de amônia; pH 6,8.

Foram aplicados 40 µg de proteína por poço e a separação eletroforética foi realizada com corrente fixa de 20 mA por placa e voltagem livre. A corrida durava aproximadamente 2h e 30 min. Foram utilizados 250 ml de tampão superior (190 mM de glicina, 25 mM de

Tris e 0,1% de SDS, pH 8,3) e 800 ml de tampão inferior (50 mM de Tris; pH 8,3) (LAEMMLI, 1970).

3.3.12 – ELETROTRANSFERÊNCIA

Para eletrotransferência, os géis foram equilibrados durante 15 minutos em tampão de transferência (24,8 mM de Tris, 192 mM de Glicina, 20% de metanol; pH 8,3). As membranas de nitrocelulose foram igualmente equilibradas, inicialmente em água deionizada (5 min) e posteriormente em tampão de transferência (10 min). As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, conforme descrito originalmente por TOWBIN (1979). O “sanduíche” foi montado, no sentido do pólo negativo para o positivo, obedecendo a seguinte ordem: espuma de suporte, papel filtro, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada durante 3 horas, em uma cuba de eletrotransferência contendo 300 ml de tampão (4°C), usando corrente fixa de 400 mA. Após as membranas foram coradas com solução de Ponceau (0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético) para controle da transferência das proteínas.

3.3.13 – IMUNODETECÇÃO

As membranas contendo as proteínas, foram lavadas com TBS (20 mM de Tris, 137 mM de NaCl, pH 7,6), para retirar o Ponceau e remanescentes da eletrotransferência. A seguir foram bloqueadas por 1h, (temperatura ambiente) com 5% de leite desnatado Molico[®], diluído em TBS. Após esse bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 min com TBS-T (Tween-20 0,05%, 20 mM de Tris, 137 mM de NaCl, pH 7,6). As membranas foram incubadas com: anticorpo monoclonal anti-vimentina 1:1.000; anticorpo policlonal anti-GFAP 1:5.000 durante 12 horas a 4°C. Após as incubações, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 vezes de 5 min) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com

anticorpos secundários específicos (conjugados à peroxidase). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS (5 min cada lavagem), sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas através de kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech), conforme recomendações do fabricante. Neste processo, a peroxidase catalisa a oxidação do luminol em presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol que imprime as bandas correspondentes às proteínas em filmes autoradiográficos. As bandas protéicas detectadas foram medidas por densitometria óptica (D.Os) através do programa computacional Scion Image[®], (National Institutes of Health). As D.Os correspondem às medidas do imunocontéudo das bandas protéicas analisadas.

3.3.14 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE VIMENTINA E GFAP

3.3.14.1- Extração de RNAs totais

Células do astrocitoma U-87 foram cultivadas em placas de 6 poços pré-revestidas com FN, LN ou Col IV, a uma densidade de 10^5 células/cm² durante 96 horas nas condições de cultivo. Após este período, o meio de cultura foi removido e os RNAs totais foram purificados utilizando reagente TRIzol[™], de acordo com as orientações do fabricante. A concentração dos RNAs totais foram estimadas por espectrofotometria a 260nm.

3.3.14.2 – Síntese do cDNA

A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir de 1µg do RNA total, obtido pela extração com o TRIzol™, utilizando um kit para transcrição reversa ThermoScript™ RT-PCR System, conforme especificações do fabricante.

3.3.14.3 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a PCR foi utilizada 2µl do cDNA em uma reação de 25µl, utilizando-se 1 unidade de enzima DNA polimerase. A amplificação ocorreu em 33 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos) com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos e uma etapa final de extensão 72°C por 7 minutos. O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e fotografado (Polaroid Gel System).

Os “primers” utilizados foram obtidos de seqüências de mRNA humanos de vimentina e GFAP disponíveis no banco de dados do “*National Center for Biotechnology Information*” (www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências escolhidas foram testadas através do programa de análise de primers Oligo-6™ e adquiridas da Invitrogen.

<i>Proteína</i>	<i>Produto</i>	<i>Seqüência (5' – 3')</i>
GAPDH	411pb	Sense –gct gag tac gtc gtg gag Antisense – gag ctt ccc gtt ca
GFAP	725pb	Sense - act caa tgc tgg ctt caa gg Antisense - tga gca ggt cct ggt act cc
Vimentina	515pb	Sense - ccc tca cct gtg aag tgg at Antisense - ctc aat gtc aag ggc cat ct

Tabela 04: *Pimers* utilizados.

3.3.14.4 – PCR semiquantitativo

Para a quantificação dos mRNAs foi realizada técnica de PCR semiquantitativo, utilizando como padrão interno “primers” para amplificação da seqüência de GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - proteína constitutiva). As duas seqüências (GAPDH e seqüências de interesse, vimentina ou GFAP) foram amplificadas em condições, de ciclos e temperatura de anelamento, pré-estabelecidos. Com o objetivo de elaborar uma curva de amplificação o cDNA foi diluído nas razões de 1, 1:5, 1:10 e 1:20. A partir da normalização dos valores das seqüências de interesse com as leituras para o amplificado de GAPDH, foram calculados as diferenças de expressão das seqüências de interesse, determinando assim a influência de proteínas da MEC na expressão de vimentina e GFAP em células de astrocitoma U-87.

3.3.15 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Newmann-Keuls, ou pelo teste t de Student, quando necessário. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Spearman (Graph Pad Prism).

5 – RESULTADOS

5.1 – EFEITOS DA FIBRONECTINA, LAMININA E COLÁGENO IV SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS DO ASTROCITOMA HUMANO U-87

Com o objetivo de avaliar os efeitos de proteínas da MEC sobre a morfologia de células U-87; estas foram cultivadas sobre fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno do tipo IV (Col IV) em intervalos de 24 e 96 horas (figura 06). As células cultivadas sobre fibronectina apresentam um padrão de adesão fibrilar, com longos e numerosos processos celulares. Sobre a matriz formada por laminina, ocorre um predomínio de adesão do tipo focal com células bem proeminentes. Os processos celulares são reduzidos em número e tamanho, sendo muito similar aos das células controle. Quando cultivadas sobre o colágeno do tipo IV, as células apresentaram um predomínio de adesão do tipo focal com numerosos e longos processos celulares. Com 96 horas de cultivo sobre FN, foi possível observar uma redução no número de processos celulares, todavia o padrão fibrilar de adesão foi mantido. As células que foram mantidas sobre LN, após 96 horas, apresentam uma morfologia similar às mantidas por 24 horas, porém ocorre um aumento no número de células com aspecto esférico, estas tendem a permanecer próximas umas das outras, como observado no controle. Na matriz formada por Col IV, as células mantêm a mesma morfologia, quando mantidas por 24 ou 96 horas, entretanto a densidade celular aumenta decorrente da proliferação celular, também possível de se observar nos demais substratos.

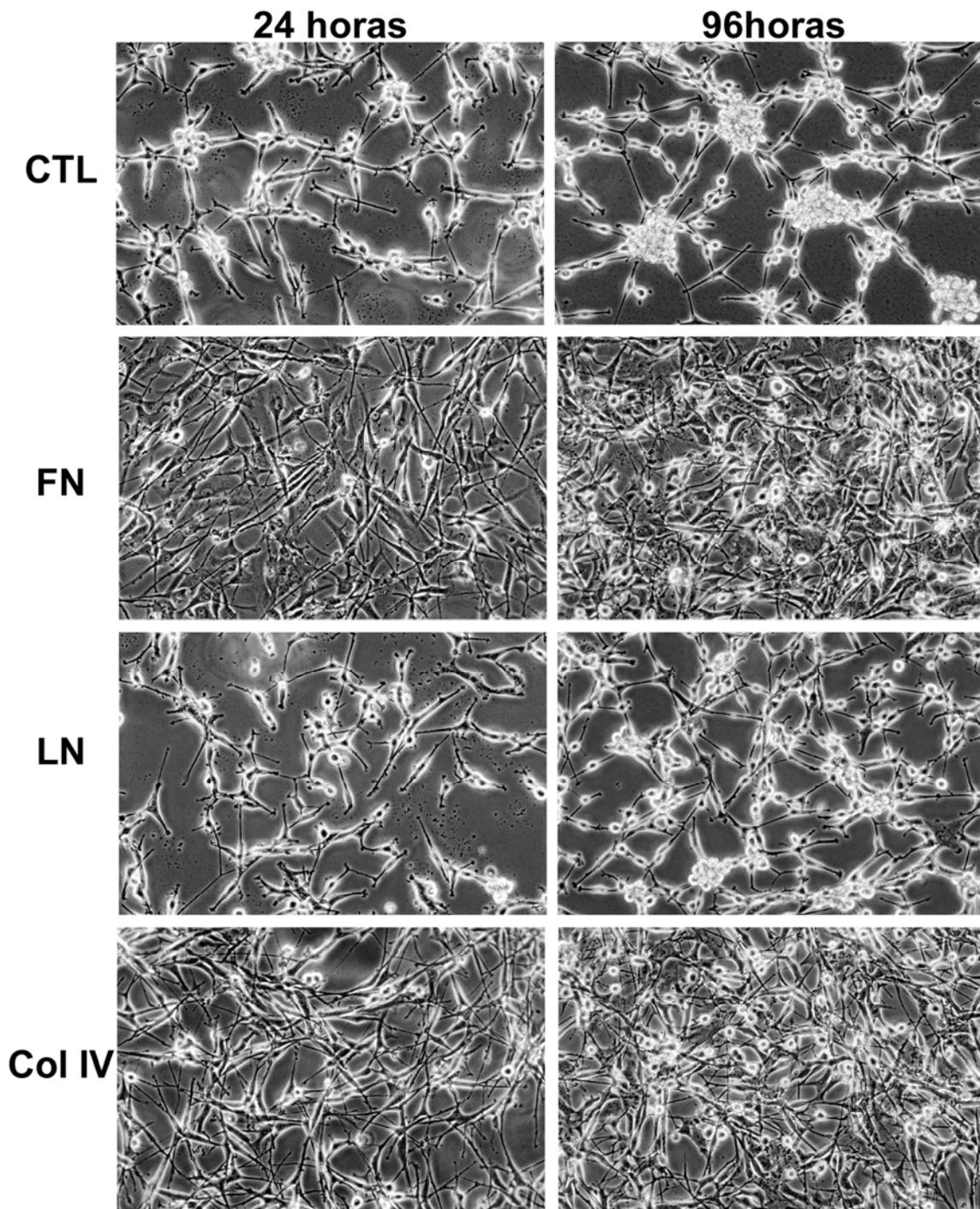


Figura 06: Morfologia das células U-87 cultivadas sobre fibronectina (FN), laminina (LN), ou colágeno IV (Col IV), em intervalos de 24 e 96 horas. As células foram fotografadas em microscópio de contraste de fase. Aumento de 200x.

5.2 – PERFIL DA CINÉTICA DE ADESÃO DE CÉLULAS U-87 SOBRE FIBRONECTINA, LAMININA OU COLÁGENO IV

A cinética de adesão das células U-87 foi testada nos diferentes substratos nos intervalos de 3, 6, 12 e 24 horas.

As células U-87 apresentaram uma rápida adesão à FN, em 3 horas mais da metade das células encontravam-se completamente aderidas. Na matriz formada por Col IV, aproximadamente 50% das células aderiram com pouco mais de 3 horas. A cinética de adesão das células U-87 sobre LN foi menor que no próprio controle, atingindo uma adesão de aproximadamente 50% das células somente com 12 horas, sendo que este mesmo valor foi atingido com menos de 9 horas nas células controle (figura 07). Após 24 horas praticamente todas as células encontram-se aderidas ao substrato.

5.3 – CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS U-87 SOBRE FIBRONECTINA, LAMININA OU COLÁGENO IV

Com o objetivo de testar se as diferentes moléculas da MEC poderiam influenciar na capacidade de proliferação das células U-87, a proliferação celular foi analisada em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas (figura 08).

A fibronectina mostrou ter efeitos positivos sobre a proliferação de células U-87 quando comparadas ao controle, induzindo um aumento significativo na proliferação em 48, 72 e 96 horas (25%, 33% e 35% respectivamente). A matriz formada por Col IV também foi capaz de estimular a proliferação das células U-87, apresentando diferenças estatísticas nos intervalos de 72 e 96 horas (17,4% e 17,6% respectivamente). Por outro lado, a laminina apresentou efeitos negativos sobre a proliferação das células U-87, inibindo significativamente sua capacidade proliferativa quando comparado ao controle em 48, 72 e

96 horas (15%, 20% e 23% respectivamente) mostrando proliferação praticamente nula em todos os intervalos de tempo.

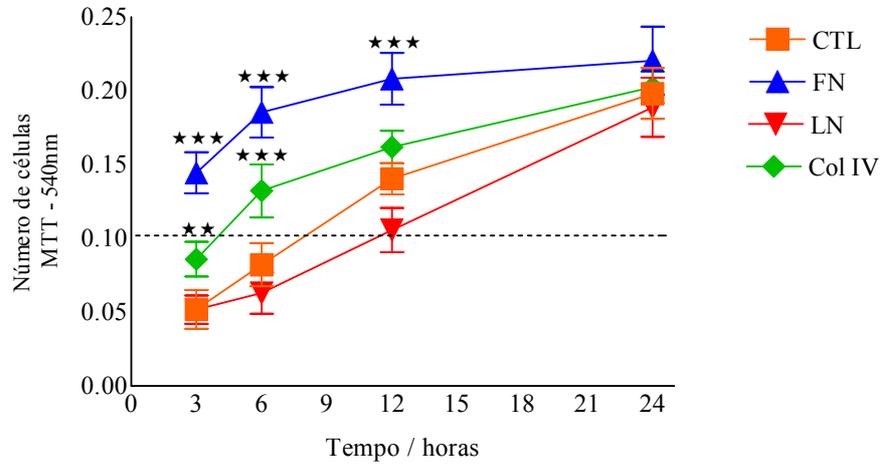


Figura 07: Adesão de células U-87 sobre fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV) em intervalos de 3, 6, 12 e 24 horas. Após 24 horas, em todos os substratos, a adesão celular ocorre de forma homogênea. A linha tracejada representa aproximadamente 50% das células totais. Os valores expressam a média de três experimentos, sendo o intervalo de confiança de 95%, onde ** = diferença significativa com $p < 0,01$; *** = diferença significativa com $p < 0,001$. As barras mostram desvio padrão com $n=6$.

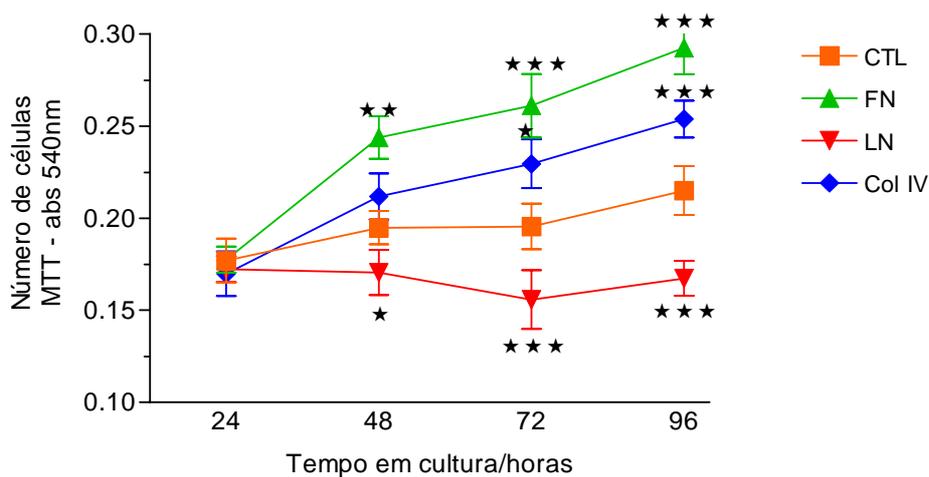


Figura 08: Curva de proliferação de células U-87 sobre fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV) em intervalos de 24,48, 72 e 96 horas. Os valores expressam a média de quatro experimentos, sendo o intervalo de confiança de 95%, onde * = diferença significativa com $p < 0,05$; ** = diferença significativa com $p < 0,01$; *** = diferença significativa com $p < 0,001$. Diferenças em relação ao controle. As barras mostram desvio padrão com $n=6$.

5.4 – MIGRAÇÃO DE CÉLULAS U-87 SOBRE FIBRONECTINA, LAMININA OU COLÁGENO IV

Com o intuito de verificar se as diferentes moléculas da MEC teriam algum efeito sobre a capacidade de migração das células U-87, foram realizados ensaios de migração sobre fibronectina, laminina ou colágeno IV. KACZAREK *et al.* (1999) descrevem, para células de gliomas, diferenças nos padrões de migração quando as células encontram-se em monocamadas ou em agregados celulares. Portanto, para verificar de forma mais adequada as influências da MEC sobre a migração de células U-87, foram realizadas duas modalidades de ensaios de migração, a partir de monocamadas e a partir de agregados celulares.

5.4.1 – Migração a partir de monocamadas

As monocamadas de células U-87 apresentaram uma elevada capacidade de migração sobre o substrato formado por FN, com um aumento de 125% e Col IV com um aumento de 175%, quando comparadas ao controle. Sobre a laminina a migração foi similar a do controle, não apresentando diferenças significativas (figura 09 e 11).

5.4.2 – Migração a partir de agregados celulares

O padrão de migração das células U-87 a partir de agregados celulares apresentou algumas diferenças em relação à migração a partir de monocamadas. A migração foi igualmente maior sobre FN e Col IV, quando comparados aos demais substratos, porém, ao contrário do que ocorreu na migração a partir de monocamadas, a migração sobre a FN foi superior em relação ao Col IV (19,5x e 15,5x maior que o controle). Nesta modalidade de ensaio também foi observado um aumento significativo da migração de células U-87 sobre a laminina (7,5x maior que no controle). A migração no grupo controle foi extremamente baixa, muito próxima a zero (figura 10 e 11).

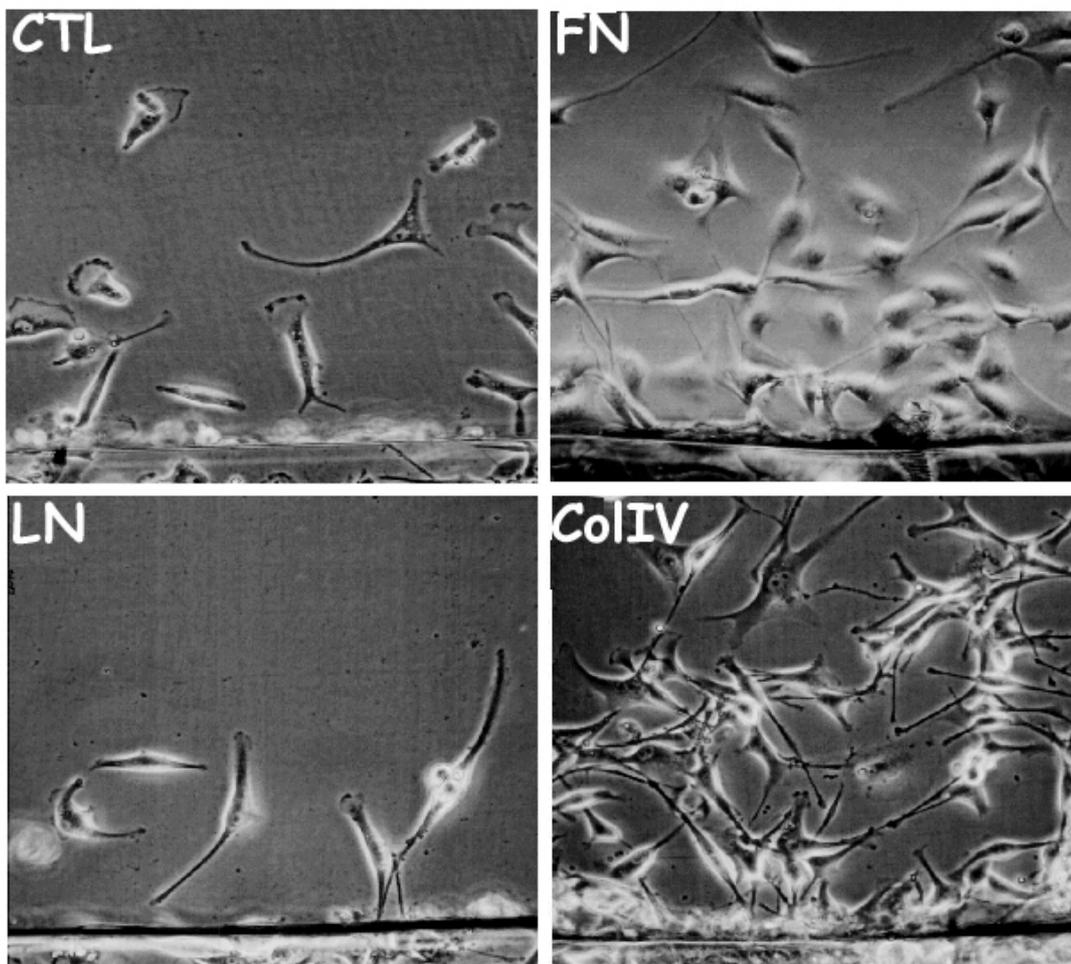


Figura 09: Migração de células U-87 a partir de monocamadas. A migração ocorreu durante 8 horas sobre substratos formados por fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV). A linha escura na base das imagens representa o ponto de partida das células. A migração nos diferentes substratos foi quantificada e os dados estão expostos na figura 11.

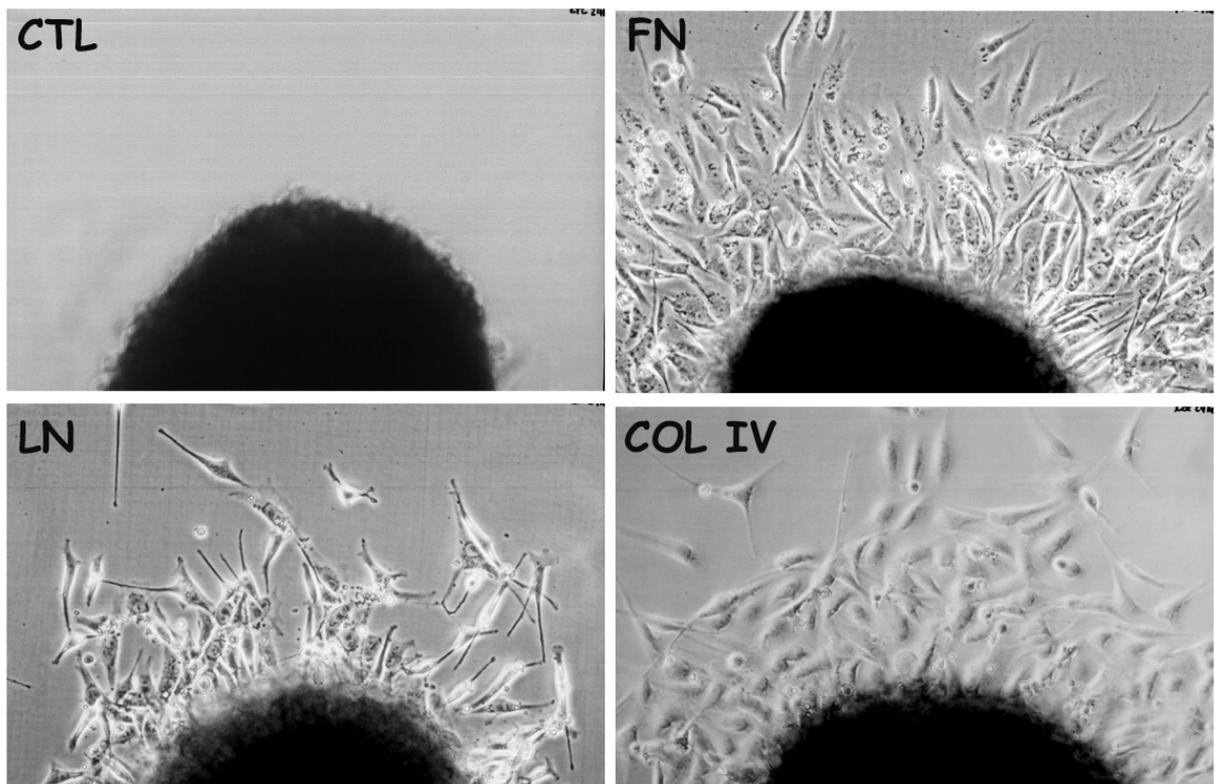


Figura 10: Migração de células U-87 a partir de agregados celulares. A migração ocorreu durante 12 horas sobre substratos formados por fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV). A migração nos diferentes substratos foi quantificada e os dados estão expostos na figura 11.

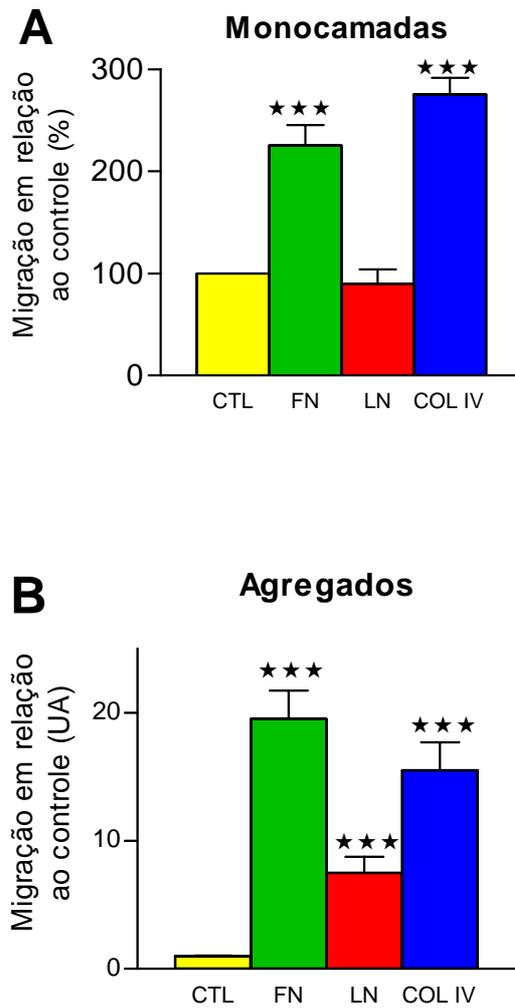


Figura 11: Quantificação da migração de células U-87 sobre FN, LN ou Col IV a partir de monocamadas (**A**) e agregados celulares (**B**). Em **A** é possível observar uma maior migração sobre o Col IV, seguido da FN, todavia em **B** este padrão se inverte. Sobre LN a migração em **A** não difere do controle, já em **B** apresenta diferenças significativas. Os valores expressam a média de quatro experimentos, sendo o intervalo de confiança de 95%, onde ***= diferença significativa com $p < 0,001$. UA = unidade arbitrária. As barras mostram desvio padrão com $n=5$. UA= unidade arbitrária.

5.5 – INFLUÊNCIAS DE PROTEÍNAS DA MEC SOBRE A EXPRESSÃO DE FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS GLIAIS – VIMENTINA E GFAP – EM CÉLULAS U-87

Os filamentos intermediários são compostos por proteínas que normalmente apresentam uma meia-vida relativamente longa (RUTKA, 1997). Para verificar com maior eficiência as influências da fibronectina, laminina ou colágeno IV sobre a expressão de vimentina e GFAP nas células U-87, foram medidos o conteúdo protéico e a quantidade de RNAm para estes filamentos intermediários.

5.5.1 – Análise do conteúdo protéico de vimentina e GFAP em células U-87 cultivadas sobre diferentes proteínas da MEC

Os conteúdos protéicos de vimentina e GFAP foram mensurados após permanência das células U-87 sobre fibronectina, laminina ou colágeno IV em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Sobre todas as matrizes testadas houve um aumento no conteúdo de vimentina com o passar do tempo, sendo que sobre as matrizes de FN e Col IV foram observados os maiores aumentos de vimentina em relação ao tempo inicial de 24 horas; +112,96% e +111,92% respectivamente. Analisando individualmente cada grupo durante os intervalos de 24 a 96 horas, sobre o controle e LN ocorreram aumentos muito próximos no conteúdo de vimentina de aproximadamente 36% em ambos (tabela 05 e figura 12).

O conteúdo de GFAP foi bastante dinâmico nos diferentes substratos, nos intervalos entre 24 e 48 horas, foi possível observar uma redução no conteúdo de GFAP nos substratos de FN, LN e Col IV, sendo sobre FN e Col IV as maiores reduções (60% e 75% respectivamente). Na condição controle houve aumento de 174% no conteúdo de GFAP. Sobre a LN houve uma pequena redução de 20% no conteúdo de GFAP entre 24 e 96 horas (tabela 06 e figura 12).

Analisando a correlação entre os conteúdos de vimentina e GFAP nos diferentes intervalos de tempo, foram encontradas correlações inversas nos grupos controle e Col IV, os demais grupos apesar de não apresentarem correlações estatísticas entre os conteúdos de vimentina e GFAP também demonstram uma tendência de correlação inversa (tabela 07).

	Vimentina entre 24 e 96 horas
CONTROLE	+36,66% (\pm 4,59%)
Fibronectina	+ 112,96% (\pm 14.17%)
Laminina	+36,92% (\pm 9,52%)
Colágeno IV	+ 111,92% (\pm 10,4%)

Tabela 05: Conteúdo de vimentina em células U-87 cultivadas sobre FN, LN, ou Col IV em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas.

	GFAP entre 24 e 96 horas
CONTROLE	+ 174,59% (\pm 24,59%)
Fibronectina	-60,65% (\pm 15.17%)
Laminina	-19,83% (\pm 9,97%)
Colágeno IV	-75,10% (\pm 16,52%)

Tabela 06: Conteúdo de GFAP em células U-87 cultivadas sobre FN, LN, ou Col IV em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas.

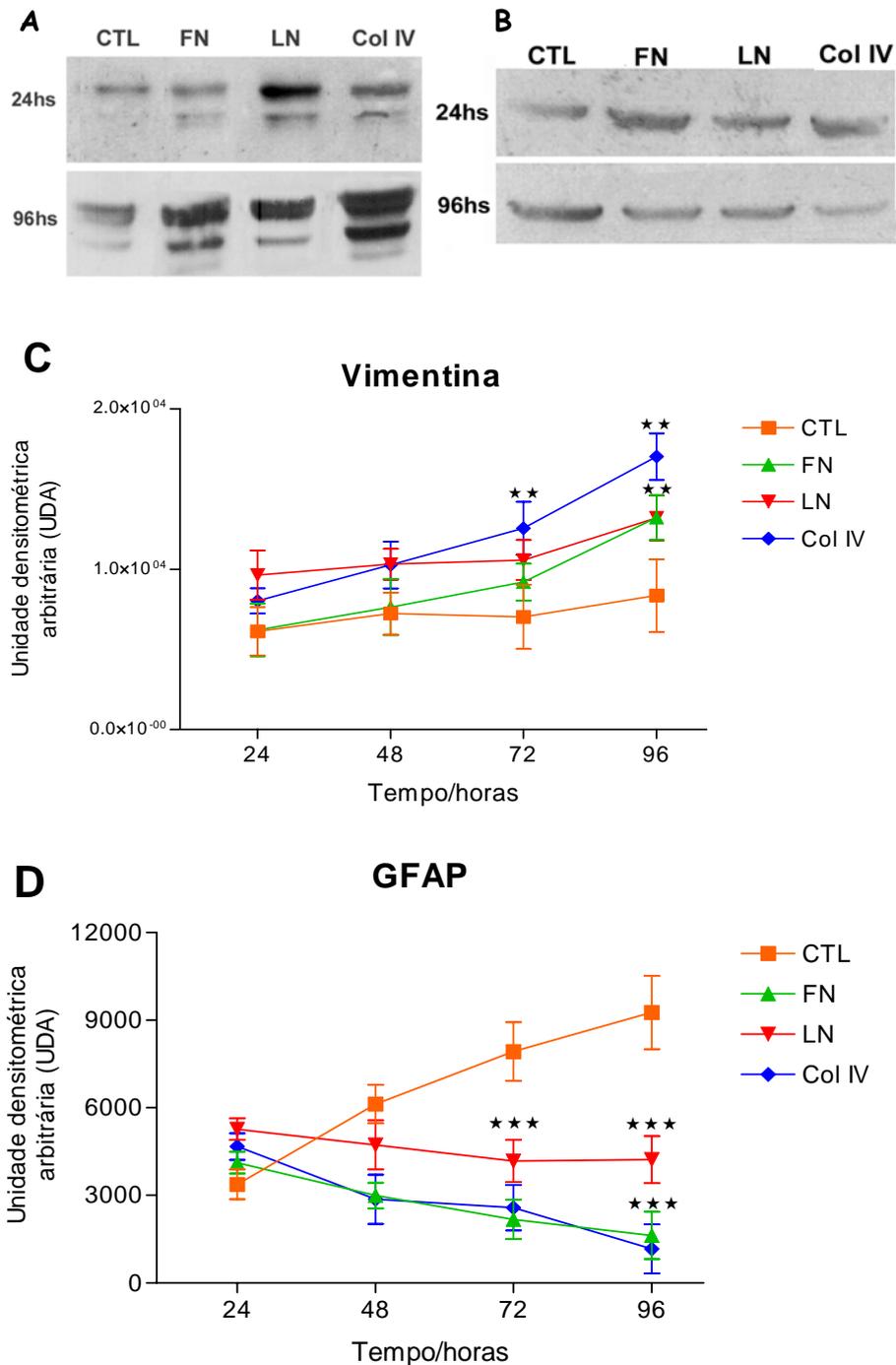


Figura 12: Conteúdo de vimentina e GFAP em células U-87. Estas células foram cultivadas sobre fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV) em intervalos de 24,48, 72 e 96 horas. **A.** Imunoconteúdo de vimentina em 24 e 96 horas; **B** Imunoconteúdo de GFAP em 24 e 96 horas; **C.** Gráfico mostrando resultados obtidos após quantificação dos conteúdos de vimentina em 24, 48, 72 e 96 horas. **D.** Gráfico mostrando resultados obtidos após quantificação dos conteúdos de GFAP em 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores dos gráficos expressam a média de quatro experimentos, sendo o intervalo de confiança de 95%, onde ** = diferença significativa com $p < 0,01$; ***= diferença significativa com $p < 0,001$. Diferenças em relação ao controle.

5.5.2 – Análise do conteúdo de RNAm para vimentina e GFAP em células U-87 cultivadas sobre diferentes proteínas da MEC

O aumento no conteúdo de uma determinada proteína, não necessariamente está relacionado com aumento na expressão, outros mecanismos podem estar envolvidos como, por exemplo, degradação. Com o intuito de verificar se as alterações nos conteúdos de vimentina e GFAP observados estariam relacionados com alterações na expressão destas proteínas, foram analisados os níveis de RNAm para vimentina e GFAP em células U-87 cultivadas sobre FN, LN ou Col IV no intervalo de 96 horas.

Os níveis de RNAm tanto para vimentina, quanto para GFAP, em relação ao controle, foram muito similares aos dados obtidos com o conteúdo protéico em todos os substratos testados (figura 13).

	Correlação Vimentina x GFAP	Correlação R²	Spearman r
CONTROLE	Sim	0,95	-0,97
Fibronectina	Não	0,83	-0,91
Laminina	Não	0,47	-0,68
Colágeno IV	Sim	0,91	-0,95

Tabela 07: Correlação entre os conteúdos de vimentina e GFAP em células U-87 cultivadas sobre FN, LN ou Col IV, em intervalos de 24, 48, 72, 96 horas. O R² indica o grau de correlação, as amostra foram consideradas correlacionadas com 95% de confiabilidade. O valor de r no teste de Spearman indica o sentido da correlação (+ positiva ou - inversa).

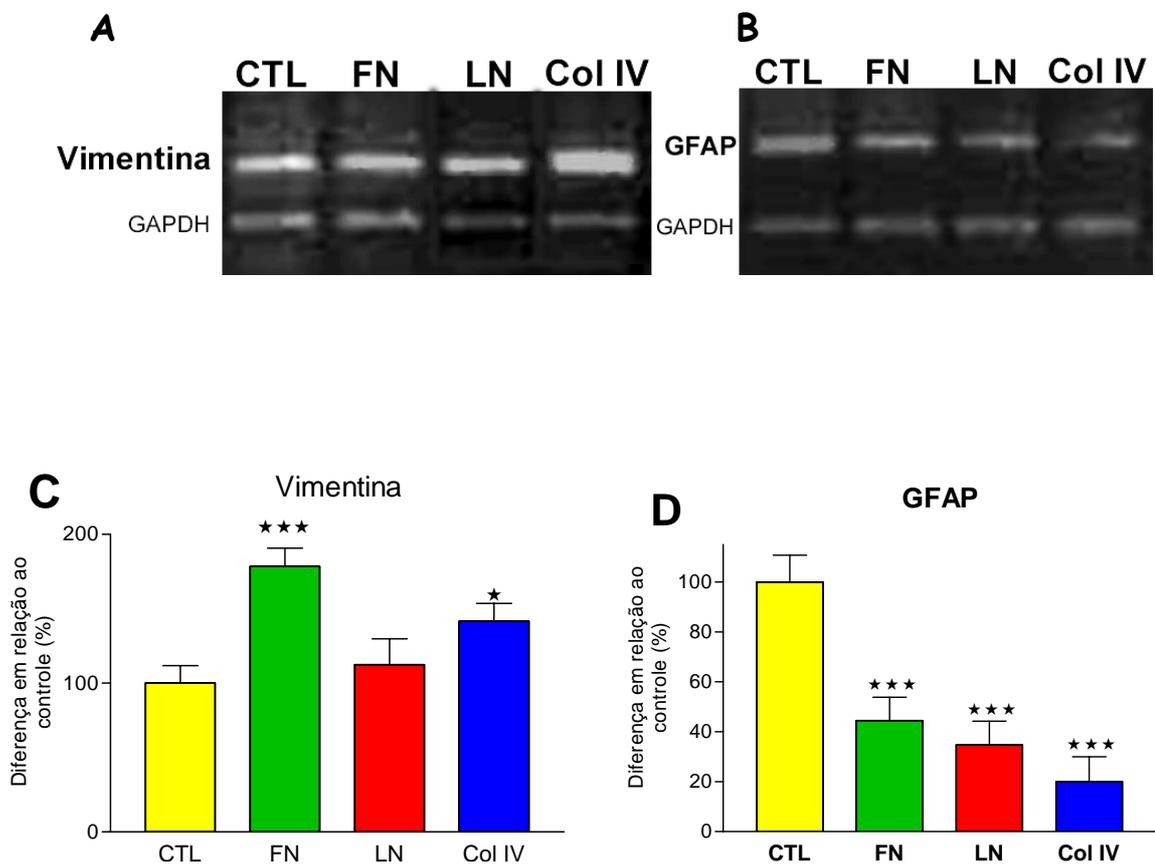


Figura 13: Quantificação do RNAm para vimentina e GFAP em células U-87 cultivadas sobre fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV) no intervalos 96 horas. **A** e **B**. Imagens de géis de agarose mostrando bandas obtidas após PCR-Semiquantitativo para vimentina e GFAP, sendo utilizado GAPDH como controle interno não variável. **C** e **D**. Gráficos elaborados após densitometria e quantificação das bandas obtidas. **C**. Vimentina e **D**. GFAP. Estes gráficos mostram as médias de três experimentos, sendo o intervalo de confiança de 95%, onde * = diferença significativa com $p < 0,05$; ***= diferença significativa com $p < 0,001$.

5.6 – ANÁLISE DAS INFLUÊNCIAS DA FN, LN E DO COL IV SOBRE A ORGANIZAÇÃO DE VIMENTINA E GFAP EM CÉLULAS U-87

Tendo observado que proteínas da MEC podem promover alterações nos padrões de expressão de vimentina e GFAP em células U-87, ensaios para a visualização da organização celular da vimentina e da GFAP foram realizados com células U-87 cultivadas sobre FN, LN ou Col IV em intervalos de tempo de 24 e 96 horas.

5.6.1 – Organização de vimentina

Na condição de controle, as redes citoplasmáticas de vimentina apresentaram-se densas, conferindo uma forte marcação por todo citoplasma, após 96 horas este padrão se manteve, porém, as células apresentaram-se com um citoplasma um pouco mais amplo, conferindo um aspecto menos denso as redes de vimentina (figura 14). A organização de vimentina, nas células U-87 cultivadas sobre FN, apresentou-se como redes bem definidas em 24 horas, sofrendo um certo adensamento após 96 horas. É possível observar um maior adensamento das fibras de vimentina nos pontos mais distais dos processos celulares após 96 horas de cultivo sobre a FN. Sobre a matriz de LN, não foi possível observar variações muito evidentes na organização de vimentina em relação ao controle, em ambos os intervalos de tempo analisados. A vimentina também se mostrou uniformemente distribuída no citoplasma das células cultivadas sobre o colágeno IV, formando redes bem definidas. Sobre a matriz de Col IV chama a atenção o adensamento de vimentina nas regiões distais dos processos celulares observado nos tempos de cultura estudados, independente se estes são longos ou curtos as regiões mais distais normalmente apresentam certo adensamento das fibras de vimentina (figura 14).

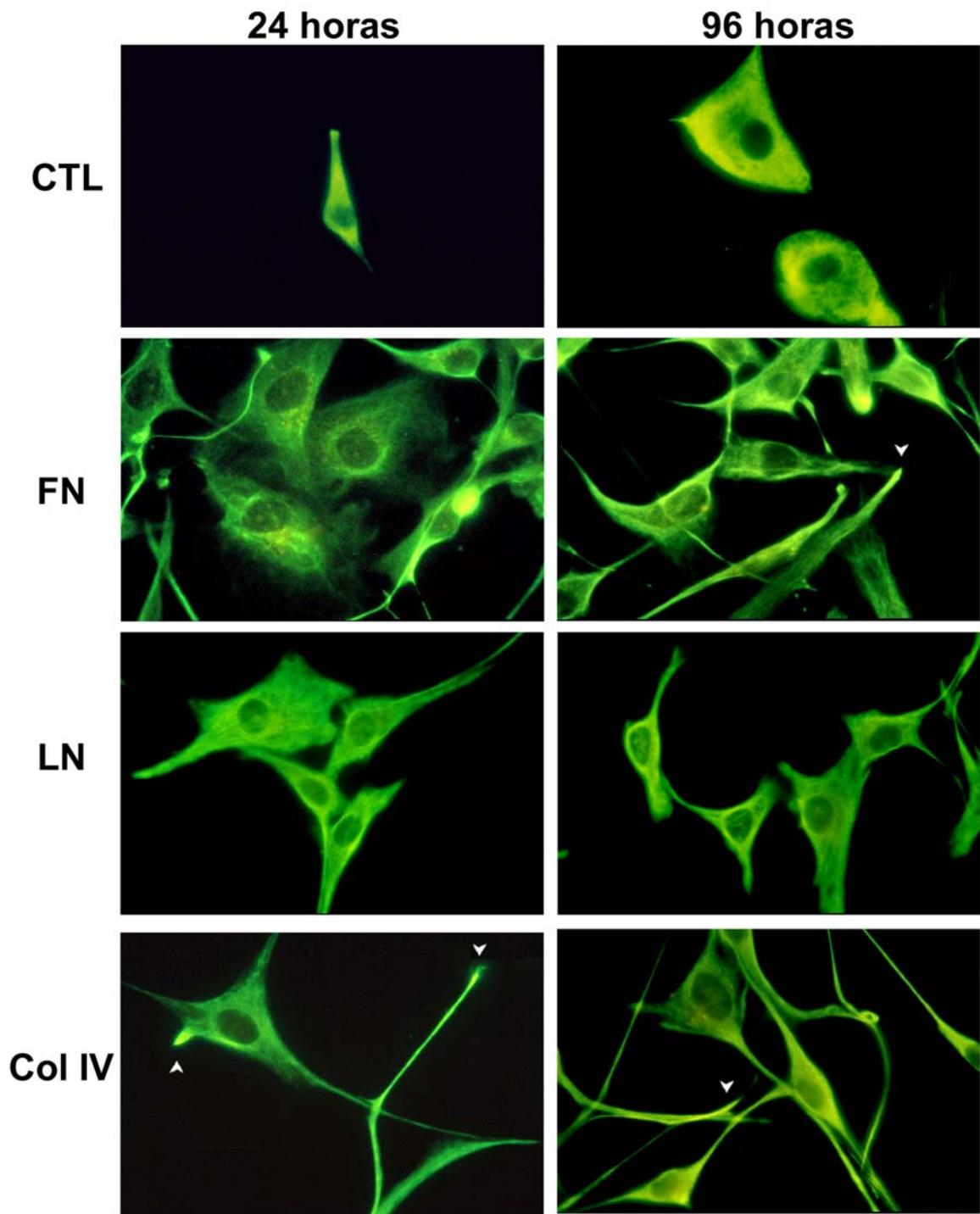


Figura 14: Imunomarcaco para vimentina em células U-87 cultivadas sobre fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV) nos intervalos de 24 e 96 horas. Setas indicam regiões de maior adensamento de vimentina nas porções distais dos processos celulares. Aumento de 1000x.

5.6.2 – Organização de GFAP

A organização de GFAP, de forma geral, não apresentou muitos detalhes. Com 24 horas de cultivo nas condições de controle, a GFAP apresenta-se com uma organização citoplasmática irregular e descontínua, dando aspecto de ponto de GFAP pelo citoplasma, sendo estes mais densos próximos das regiões perinucleares. Após 96 horas de cultivo nas condições de controle ocorre um certo adensamento da GFAP, mostrando uma marcação mais intensa. Ainda nesta condição é possível observar pequenos e discretos acúmulos de GFAP em regiões que poderiam ser relacionadas com pontos de adesão focal (figura 15). Sobre a matriz de fibronectina foi possível observar um certo adensamento de GFAP após 96 horas de cultivo, da mesma maneira que no controle, a GFAP encontra-se localizada por todo citoplasma, preferencialmente nas regiões perinucleares, sendo bastante reduzida nos processos celulares. A disposição de GFAP nas células cultivadas sobre LN é bastante semelhante à situação controle, entretanto, com apenas 24 horas de cultivo é possível observar um considerável adensamento de GFAP. Disposição de GFAP semelhante aos demais grupos também foi encontrada nas células crescidas sobre Col IV, todavia nestas células fica bem evidente a reduzida presença de GFAP nos processos celulares, tornando-os quase imperceptíveis.

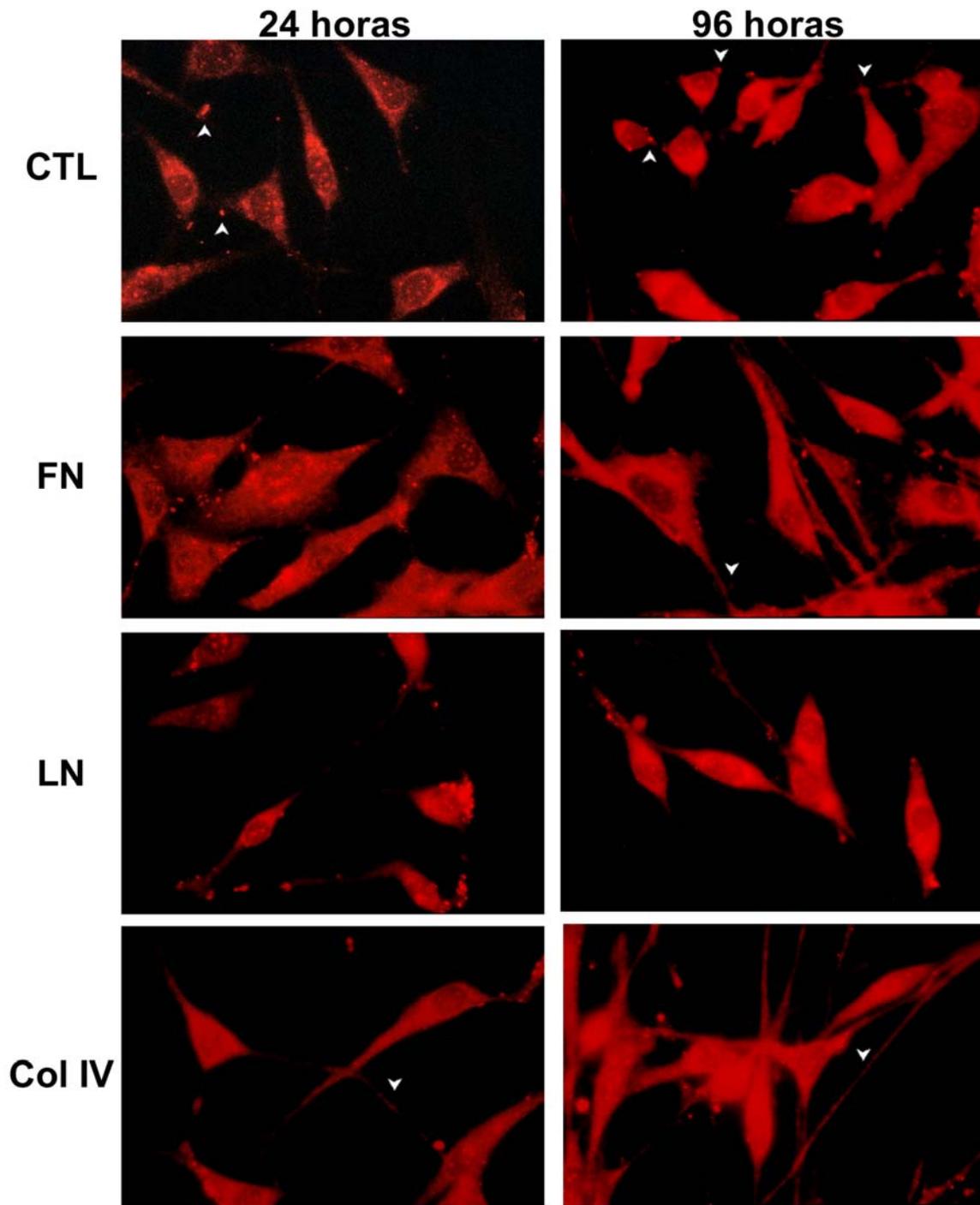


Figura 15: Imunomarcaco para GFAP em células U-87 cultivadas sobre fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno IV (Col IV) nos intervalos de 24 e 96 horas. Setas indicam no CTL regiões de maior adensamento de GFAP em prováveis pontos de adesão focal e em FN e Col IV uma fraca marcao para GFAP ao longo dos processos celulares. Aumento de 1000x.

6 – DISCUSSÃO

As relações entre matriz extracelular e células pode ser melhor entendida empregando-se alguns conceitos básicos de ecologia à este sistema. À medida que um sistema biológico passa a ser visto como um ecossistema, composto por indivíduos – células; e meio – microambiente celular; fica mais fácil compreender a biologia de tecidos normais, células tumorais e suas inter-relações, onde uma pequena alteração pode causar grandes modificações no sentido de reorganização do sistema (DEWEVER & MAREEL, 2003).

Os astrocitomas malignos são neoplasias altamente invasivas que se infiltram difundindo-se pelo parênquima cerebral. Eventos como adesão, proliferação e migração de astrocitomas *in vivo* é dependente de interações com proteínas específicas da MEC (GIESE *et al.*, 1998). A coordenação de passos envolvidos na invasão do tecido cerebral por células de astrocitoma requer a regulação de um complexo número de processos citológicos como ligação de moléculas de superfície celular a moléculas específicas de matriz extracelular, ativação de proteases específicas para degradação seletiva da MEC e interações entre MEC, membrana plasmática e citoesqueleto. É crescente o número de evidências que sugerem que os FIs podem estar envolvidos em complexos processos celulares controlando a morfologia, adesão e proliferação de células de astrocitomas (RUTKA *et al* 1999).

Neste trabalho foi demonstrado que substratos formados por fibronectina ou colágeno IV promovem uma alta adesão, proliferação e migração de células U-87 de astrocitoma humano. Estes fenômenos foram acompanhados por alterações na expressão de vimentina e GFAP. Substratos como a FN e Col IV foram responsáveis por altas taxas de migração em 8 e 12 horas e por uma alta capacidade de proliferação em 96 horas. Estes eventos foram acompanhados de modificações na expressão de vimentina e GFAP, entre 24 e 96 horas.

As relações entre FI e proteínas da MEC não são profundamente estudadas. São raros os trabalhos que apresentam algum dado substancial sobre as influências da MEC na biologia dos FI, a maioria dos trabalhos apenas sugere a inter-relação entre MEC e FI, todavia sem uma sustentação experimental conclusiva. As diferentes proteínas da MEC foram capazes de

promover alterações distintas na expressão e organização de vimentina e GFAP em células U-87. Sobre a matriz de FN as células U-87 apresentaram um grande aumento na expressão de vimentina (112%) acompanhada por uma redução na expressão de GFAP (60%) em relação ao controle em 96 horas. Este mesmo padrão foi observado sobre a matriz de Col IV onde a redução na expressão de GFAP foi ainda maior (75%). Sobre a matriz de LN, as células U-87 apresentaram modificações na expressão de vimentina e GFAP mais discretas (+36%; - 20%, respectivamente). MENET *et al.* (2001) sugerem que alterações nos FIs de astrócitos promoveriam modificações na afinidade dos receptores de integrinas, levando a uma alteração na expressão de moléculas de MEC. Considerando estas observações, poderia ser dito que o inverso também pode ser verdadeiro, ou seja, diferentes moléculas de MEC poderiam ligar-se a específicos receptores de integrinas promovendo uma reorganização celular que acarretaria em alterações na expressão e organização de FI.

GIESE *et al.* (1998), demonstraram que células de gliomas humanos apresentam um padrão de adesão diferenciado em distintas regiões do SNC. Nas membranas aracnóides, ricas em fibronectina e colágenos I e IV, estes autores observaram uma rápida adesão das células de glioma, já em determinados vasos sanguíneos a adesão se processou de forma mais lenta, este fator foi associado à exposição de diferentes moléculas de MEC como Col IV e LN. As células do astrocitoma humano U-87 apresenta uma cinética de adesão diferenciada conforme o substrato. A FN e o Col IV mostraram-se mais permissivos a adesão de células U-87. A alta capacidade de adesão das células U-87 à FN e ao Col IV foi associada a um padrão morfológico com predomínios de adesões fibrilares e presença de longos processos celulares (figura 06). ENAM *et al.* (1998) utilizando 4 linhagens de gliomas humanos observaram um efeito quimiotático positivo da fibronectina, induzindo as células a assumirem um formato mais achatado com vários prolongamentos. A redução de GFAP em células de astrocitoma que também expressam vimentina é capaz de promover alterações na morfologia como formação de processos celulares e redução das adesões focais (RUTKA *et al.*, 1994; RUTKA *et al.*, 1999b). Esta capacidade de modulação das propriedades de adesão de células de astrocitomas pela expressão de diferentes filamentos intermediários poderia explicar o fato, de

após 24 horas as células U-87 apresentarem o mesmo padrão de adesão nos diferentes substratos (figura 07). GIESE *et al.* (1998) mostraram que a adesão de células de astrocitoma a laminina-1 de EHS pode ser 100% bloqueada com a utilização de anticorpos contra a subunidade beta-1 do receptor de integrina. RUTKA *et al.* (1999b) observaram que a ausência de GFAP em células de gliomas estava correlacionada com modificações específicas na subunidade beta-1 do receptor de integrina. Estes dados permitem sugerir que a reduzida cinética de adesão das células U-87 sobre laminina poderia estar sendo compensada por uma modificação na expressão de FI, mesmo que de forma discreta, levando a uma modulação nos receptores de LN aumentando gradativamente a capacidade de a adesão das células U-87 à LN.

A regulação do ciclo celular e a modulação da adesão são respostas relacionadas com elementos da matriz extracelular, envolvendo mecanismos específicos ainda não totalmente identificados. É conhecido que a sinalização via receptores de integrinas ou ativação de receptores de fatores de crescimento é necessária para a passagem da fase G1 para S, levando a proliferação celular (BORNSTEIN & SAGE, 2002). Os substratos formados por FN e Col IV apresentaram efeitos positivos sobre a proliferação de células U-87. MENDES DE AGUIAR *et al.* (2002) demonstraram que em células de glioma de rato C6, a FN e o Col IV também apresentam efeitos estimulatórios sobre a proliferação. O aumento na capacidade de proliferação das células U-87 induzidas pelos substratos de FN e Col IV pode estar relacionado com o aumento da expressão de vimentina e redução na expressão de GFAP. BOYER (1990) observou que durante o processo de fechamento das vesículas óticas em embriões E11 de camundongos ocorre uma intensa proliferação celular associada à alta expressão de vimentina, mais tarde esta vimentina é substituída por GFAP (E18) caracterizando o início da fase de diferenciação celular que é associada a baixas taxas de proliferação destas células. O tratamento *antisense* para GFAP em células de astrocitoma

humano demonstrou aumentar a capacidade de proliferação destas células, também foi possível observar um aumento na expressão de vimentina, nestina, filamento de actina e CD44 (RUTKA, 1994; ENG, 2000). Culturas de astrócitos de animais que não expressam GFAP apresentam uma maior densidade de saturação (PEKNY *et al.*, 1998b). A análise das células U-87 em condições de controle vem corroborar com estes dados, uma vez que nestas condições a expressão de GFAP teve um aumento de 174% entre 24 e 96 horas e a proliferação celular foi muito reduzida. As baixas taxas de proliferação das células U-87 sobre a LN, podem estar relacionadas com a reduzida capacidade deste substrato de estimular alterações na expressão de vimentina e GFAP, ou ainda com a incapacidade destas células de reconhecer adequadamente a LN, pela falta de expressão de receptores adequados.

Os processos de migração celular, de forma geral, incluem um grupo de mecanismos coordenados como a polarização morfológica, extensão da membrana, expressão de moléculas de adesão, força contrátil, tração e liberação das ligações (BELOT *et al.*, 2001). Substratos que promovem rápida adesão também são abeis para promover migração (GIESE *et al.*, 1998). De forma geral, as células U-87 apresentaram alta capacidade de migração sobre as matrizes de FN e Col IV. KACZAREK *et al.* (1999) utilizando um painel de 13 linhagens de gliomas estabeleceram que o número de adesões focais é inversamente correlacionado com a mobilidade celular, todavia um certo número de adesões focal é requerido para ser realizado o processo de migração celular. Estes autores também descrevem que o a capacidade de adesão de gliomas esta correlacionada com a migração. Os resultados obtidos com as células U-87 estão de acordo com estas observações, pois sobre FN e Col IV, onde foram observadas as maiores taxas de migração, também foi observado um padrão de adesão predominantemente do tipo fibrilar com poucas regiões de adesão focal (figura 06), além disso sobre estes substratos foram obtidas as maiores velocidades de adesão das células U-87 (figura 07). Não é apenas como suporte mecânico que a MEC participa do processo de adesão celular.

Pequenos fragmentos solúveis de FN são capazes de induzir a alterações fenotípicas associadas à migração como formação de fibras de estresse e polarização celular (GIESE *et al.*, 1998). O aumento na expressão de vimentina e a redução na expressão de GFAP induzidas pela FN e Col IV nas células U-87 podem estar diretamente relacionadas com as altas taxas de migração nestes substratos. RUTKA *et al.* (1999) observaram que células, como a U343 que apresentam alta expressão de GFAP, têm baixa capacidade de migração. Estes autores também demonstram que células de astrocitoma U-251 após tratamento *antisense* para GFAP apresentam um aumento na capacidade de migração. Muitos autores relatam que as células gliais do sistema nervoso que apresentam alta expressão de vimentina e baixa expressão de GFAP têm maior habilidade para migrar, pelo fato de tratarem-se de células indiferenciadas. MENET *et al.* (2001) observaram que astrócitos que não expressam GFAP formam um microambiente semelhante aos das vias de migração das células da crista neural. ELIASSON *et al.* (1999) demonstram que a vimentina está relacionada com o controle da rigidez celular, onde a falta da vimentina conferiria um aspecto mais rígido às células gliais reduzindo a eficiência em eventos como migração e invasão.

Analisando de forma mais cuidadosa os perfis de migração das células U-87 é possível observar diferenças nos padrões de migração, sobre os diferentes substratos, nos ensaios onde as células partem de monocamadas ou de agregados celulares (figura 11). A migração de células U-87 a partir de monocamadas foi maior no substrato formado por Col IV, seguido pela FN (175% e 125% respectivamente em relação ao controle), já na migração a partir de agregados celulares, a FN foi capaz de estimular maior migração seguido pelo Col IV e LN (19,5x; 15,5x e 7,5x respectivamente maior em relação ao controle). Na migração a partir de monocamadas as células apresentam, relativamente, pouco contato com as células vizinhas, mas um grande contato com o substrato. Para o processo de migração a partir de agregados é necessário que a célula libere-se da organização tridimensional do agregado. Os agregados de

células tumorais apresentam uma matriz extracelular própria, bem como fortes interações entre as células como, por exemplo, via junções GAP. Para migrar sobre uma matriz fixada numa superfície plana é necessário que a célula libere-se das ligações com a MEC do agregado, libere-se das interações célula-célula, ligue-se a matriz do teste e migre sobre esta (KACZAREK *et al.* 1999). Tem sido demonstrado que a redução das junções GAP favorece a migração de células originárias de agregados celulares (MCDONOUGH *et al.* 1999).

Com o aumento da anaplasia em tumores gliais ocorre uma progressiva redução na expressão de GFAP e aumento na expressão de vimentina (DEARMOND *et al.*, 1980; DUFFY *et al.*, 1982; RUTKA *et al.*, 1999). Com base nestas informações e nos resultados obtidos neste trabalho poderia ser feita uma relação entre desdiferenciação celular, marcada pelo aumento de vimentina e redução de GFAP, e aumento de agressividade (proliferação, migração, adesão), todavia vale a pena lembrar que existem situações, como por exemplo, na gliose reativa, em que células de origem glial apresentam aumento na expressão de GFAP, acompanhado de aumento na proliferação e migração celular. Os FIs gliais não devem ser considerados como simples marcadores de diferenciação celular, eles poderiam, num sentido mais amplo, ser considerados como um fator determinante para a modulação do comportamento celular que atuam juntamente com outros elementos.

Com base nos dados discutidos acima é possível estabelecer relações entre MEC, filamentos intermediários e comportamento celular. Como num ecossistema, onde todos os elementos são capazes de interagir entre si e alterarem uns aos outros. A tríade formada por FI, MEC e comportamento celular formaria um triângulo onde cada elemento apresenta influências sobre os outros.

7 – CONCLUSÕES

- As células U-87 apresentam diferentes potencialidades de adesão a fibronectina, laminina e ao colágeno IV, acompanhadas de uma estruturação morfológica característica;
- As matrizes formadas por fibronectina e colágeno IV foram capazes de estimular um aumento na expressão de vimentina e redução na expressão de GFAP;
- A fibronectina e o colágeno IV apresentaram efeitos positivos sobre a proliferação e migração das células U-87;
- O fenótipo caracterizado pela alta expressão de vimentina e baixa expressão de GFAP parece estar relacionado com as elevadas taxas de proliferação e migração das células U-87;

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOSEIF, S.; EL-SAKKA, A.; YOUNG, P. ;CUNHA, G. (1999). Mesenchymal reprogramming of adult human epithelial defferentiation. *Differentiation* **65**: 113-118.
- AKYAMA, Y.; YUNG, S.; SALHIA, B.; LEE, S.; HUBBARD,S.; TAYLOR, M.; MAINPRIZE, T.; AKAISHI, K.; VAN FRUTH, W.; RUTKA, J. T. (2001). Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. *J. Neurooncol.* **53**: 115-127.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. (1997). *Biologia Molecular da Célula*. 3ª edição. *Editora Artes Médicas Ltda*. Porto Alegre, RS, Brasil. 2064p.
- BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J. (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain protein. *FASEB J.* **4**: 148-160.
- BELOT, N.; RORIVE, S.; DOYEN, I.; LEFRANC, F.; BRUYNEEL, E.; DEDECKER, R.; MICIK, S.; BROTCHE, J.; DECAESTECKER, C.; SALMON, I.; KISS, R.; CAMBY, I. (2001). Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features. *Glia* **36**: 375-390.
- BONGCAN-RUDLOFF, E.; NISTER, M.; BETSHOLTZ, C.; WANG, J. L.; STENMAN, G.; HEUBNER, K.; CROCE, C. M.; WESTERMARK, B. (1991). Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Res.* **51**: 1553-1560.
- BORNSTEIN, P. & SAGE, E. H. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 608-616.
- BOUCAUT, J. C.; JOHNSON, K. E.; DARRIBERE, T.; DELARUE, M. (1990). Fibronectin-rich fibrillar extracellular matrix controls cell migration during amphibian gastrulation. *Int. J. Dev. Biol.* **34**: 139-147.

- BOYER, S.; MAUNOURY, R.; GOMES, D.; DE NECHAUD, B.; HILL, A. M.; DUPOUEY, P. (1990). Expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in mouse lens epithelial cells during development in vivo and during proliferation and differentiation in vitro: comparison with the developmental appearance of GFAP in the mouse central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **27**: 55-64.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- CAPETANAKI, Y.; MILNER, D. J.; WIETZER, G. (1997). Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct. Funct.* **22**: 103-116.
- CAPETANAKI, Y.; SMITH, S.; HEATH, J. P. (1989). Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice exhibits normal lens cell differentiation. *J. Cell Biol.* **109**: 1653-1664.
- CASTRO, M. G.; COWEN, R.; WILIAMSON, I. K.; DAVID, A.; JIMENEZ-DALMARONI, M. J.; YUAN, X.; BIGLIARI, A.; WILLIAMS, J. C.; HU, J.; LOWENSTEIN, P. R. (2003). Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharm. Therapeutics* **98**: 71-108.
- CHENG, Y-S; CHAMPLIAUD, M-F; BURGESSON, R. E.; MARINKOVICH, M. P; YURCHENCO, P. D. (1997). Self-assembly of laminina isoforms. *J. Biol. Chem.* **272**: 31525-31532.
- CHINTALA, S. K.; GOKASLAN, Z. L.; GO, Y.; SAWAYA, R.; NICOLSON, G. L.; RAO, J. S. (1996). Role of extracellular matrix proteins in regulation of human glioma cell invasion in vitro. *Clin. Exp. Metastasis* **14**: 358-366.
- CLARK, E. A. & BRUGGE, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**: 233-239.
- CLARKE, E. J. & ALLAN, V. (2002). Intermediate filaments: Vimentin moves in. *Curr. Biol.* **12**: 596-598.

- COCHARD, P. & PAULIN, D. (1984). Initial expression of neurofilamentos and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo*. *J. Neurosci.* **4**: 2080-2094.
- COFFIN, C. M.; MUKAI, K.; DEHNER, L. P.; (1983). Glial differentiation in medulloblastomas. Histogenetic insight, glial reaction, or invasion of brain? *Am. J. Surg. Pathol.* **7**:555-565.
- COLLUCCI-GUYON, E.; PORTIER, M. M.; DUNIA, I.; PAULIN, D.; POURNIN, S.; BABINET, C. (1994). Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* **79**: 679-694.
- DEARMOND, S. J.; ENG, L. F.; RUBINSTEIN, L. J. (1980). The application of GFAP immunohistochemistry in neuro-oncology. *Pathol. Res. Pract.* **168**: 374-394.
- DEWEVER, O. & MARCEEL, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.* **200**: 429-447.
- DUFFY, P. E.; HUANG, Y. Y.; RAPPORT, M. M. (1982). The relationship of GFAP to the shape, motility and differentiation of human astrocytoma cells. *Exp. Cell Res.* **139**: 145-157.
- EBERT, A. D.; WECHSELBERGER, C.; NEES, M.; CLAIR, T.; SCHALLER, G.; MARTINEZ-LACACI, I.; WALLACE-JONES, B.; BIANCO, C.; WEITZEL, H. K.; SALAMON, D. S. (2000). Cripto-1 induce in vimentin expression is associated with enhanced migration of human Caski cervical carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **257**: 223-229.
- EBERT, A.; PASCHKE, S.; JAINTA, S.; ZHANG, Y.; VASSY, J.; RIGAUT, J. P.; BEIL, M. (2001). Remodeling of vimentin cytoskeleton correlates with enhanced motility of promyelocytic leukemia cells during differentiation induces by retinoic acid. *Anticancer Res.* **21**: 3973-3980.
- ECKES, B.; DOGIC, D.; COLUCCI-GUYON, E.; WANG, N.; MANIOTIS, A.; INGBER, D.; MERCKLING, A.; LANGA, F.; AUMAILLEY, M.; DELOUVÉE, A.; KOTELIANSKY, V.; BABINET, C. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblast. *J. Cell Sci.* **111**: 1897-1907.

- ELIASSON, C.; SAHLGREN, C.; BERTHOLD, C. H.; STAKEBERG, J.; CELIS, J. E.; BETSHOLTZ, C.; ERIKSSON, J. E.; PEKONY, M. (1999). Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 23996-24006.
- ENAM, S. A.; ROSENBLUM, M. L.; EDVARDBSEN, K. (1998). Role of xtracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectina-positive mesenchymal cell processes. *Neurosurgery* **42**: 599-608.
- ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neuroch. Res.* **25**: 1439-1451.
- ENG, L. F.; VANDERHAEGHEN, J. J.; BIGNAMI, A. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* **28**: 351-354.
- ENGBRING, J. A. & KLEINMAN, H. K. (2003). The basement membrane matrix in malignancy. *J. Pathol.* **200**: 465-470.
- ERRANTE, L. D.; WICHE, G.; SHAW, G. (1994). Distribution of plectin, an intermediate filament-associated protein, in the adult rat central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **37**: 515-528.
- EYDEN, B. & TZAPHLIDOU, M. (2001). Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron mocroscopy. *Micron* **32**: 287-300.
- FENG, L.; ZHOU, X.; LIAO, J.; OMARY, M. B. (1999). Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Sci.* **112**: 2081-2090.
- FIDLER, I. (1999). Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **43**: 3-10.
- FRANKE, W. W.; GRUND, C.; KUNH, C.; JACKSON, B. W.; ILLMENSEE, K. (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* **23**: 43-59.

- FREIRE, E. & COELHO-SAMPAIO, T. (2000). Self-assembly of laminin induced by acidic pH. *J. Biol. Chem.* **275**: 817-822.
- FUCHS, E. & CLEVELAND, D. W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **276**: 514- 519.
- FUCHS, E. & WEBER, K. (1994). Intermediate filaments structure, dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:345-382.
- FÜRST, D. O.; OSBORN, M.; WEBER, K. (1989). Myogenesis in the mouse embryo: Differential inset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J. Cell Biol.* **6**: 717-725.
- GALOU, M.; COLICCI-GUYON, E.; ENSERGUEIX, D.; RIDET, J. L.; GIMENEZ Y RIBOTTA, M.; PRIVAT, A.; BABINET, C.; DUPOUEY, P. (1996). Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J. Cell Biol.* **133**: 853-863.
- GAO, Y.; SZTUL, E. (2001). A novel interaction of the golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **152**: 877-893.
- GIESE, A.; LAUBE, B.; ZAPF, S.; MANGOLD, U.; WESTPHAL, M. (1998). Glioma cell adhesion and migration on human brain sections. *Anticancer Res.* **18**: 2435-2448.
- GILARD, B. K.; CLEMENT, R.; COLUCCI-GUYON, E.; BABINET, C.; SCHWARZMANN, G.; TAKI, T.; KASAMA, T.; MARCUS, D. M. (1998). Decreased synthesis of glycosphingolipids in cells lacking vimentin intermediate filaments. *Exp. Cell Res.* **242**: 561-572.
- GIMÉNEZ Y RIBOTTA, M.; RAJAOFETRA, N.; MORIN-RICHAUD, C.; ALONSO, G.; BOCHELEN, D.; SANDILLON, F.; LEGRAND, A.; MERSEL, M.; PRIVAT, A. (1995). Oxysterol (7 beta-hydroxicholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reactin. *J. Neurosc. Res.* **41**: 79-95.
- GÜNTHER, W.; SKAFTNESMO, K. O.; ARNOLD, H.; TERZIS, A. J. A. (2003). Molecular approaches to brain tumour invasion. *Acta Neurol.* **145**: 1029-1036.

- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- HENDRIX, M. J.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; TREVOR, K. T. (1997). Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am. J. Pathol.* **150**: 483-495.
- HERMANN, H. & AEBI, U. (1999). Intermediate filaments assembly: temperature sensitivity and polymorphism. *Cell Mol. Life Sci.* **55**: 1416-1431.
- HERMANN, H. & AEBI, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 79-90.
- HERVÉ-CHNEIWEISS. (1994). Interdisciplinaridade no estudo do câncer. *Revista Ciência Hoje*, **18**:1-13.
- HOFMANN, I. & FRANKE, W. W. (1997). Heterotypic interactions and filament assembly of type I and type II cytokeratins *in vitro*: viscometry and determinations of relative affinities. *Eur. J. Cell Biol.* **72**:122-132.
- HOLWELL, T. A.; SCHWEITZER, S. C.; EVANS, R. M. (1997). Tetracycline regulated expression of vimentin in fibroblasts derived from vimentin null mice. *J. Cell Sci.* **110**: 1947-1956.
- HOWE, A.; APLIN, A. E.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. (1998). Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 220-231.
- INAGAKI, M.; MATSUOKA, Y.; TSUJIMURA, K.; ANDO, S.; TOKUI, T.; TAGAHASHI, T.; INAGAKI, N. (1996). Property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. *Bioessays* **18**: 481-487.
- INAGAKI, M.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T.; INAGAKI, N. (1994). Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* **4**: 239-243.

- INAGAKI, M.; GONDA, Y.; NISHIZAWA, K.; KITAMURA, S.; SATO, S.; ANDO, S.; TANABE, K.; KIKUCHI, K.; TSUIKI, S.; NISHI, Y. (1990). Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. *J. Biol. Chem.* **265**: 4722-4729.
- INGBER, D. E.; DIKE, L.; HANSEN, L.; KARP, S.; LILEY, H.; MANIOTIS, A.; MCNAMEE, H.; MOONEY, D.; PLOPPER, G.; SIMS, J.; WANG, N. (1994). Cellular tenegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration in tissue pattern during morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* **150**: 173-224.
- KACZAREK, E.; ZAPF, S.; BOUTERFA, H.; TONN, J. C.; WESTPHAL, M.; GIESE, A. (1999). Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype. *Int. J. Devl. Neurosc.* **17**: 625-641.
- KÁLMÁN, M. & AJTAI, B. (2001). A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia on the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more details, than GFAP or vimentin. *Int. J. Dev. Neurosc.* **19**: 101-108.
- KATAYAMA, M.; SANZEN, N.; FUNAKOSHI, A.; SEKIGUCHI, K. (2003). Laminin γ 2-chain fragment in the circulation: a prognostic indicator of epithelial tumor invasion. *Cancer Res.* **63**: 222-229.
- KHASIGOV, P. Z.; KHSANBAEVA, G. S.; RUBACHEV, P. G.; NIKOLAEV, A.; GRACHEV, S. V. (1996). Proteins of the basement membrane. *Biochemistry* **61**: 1152-68.
- KLEIHUES, P.; KIESSLING, M.; JANZER, R. C. (1987). Morphological markers in neuro-oncology. *Curr. Top. Pathol.* **77**: 307-338.
- KLEIHUES, P.; SOYLEMEZOGLU, F.; SCHÄUBLE, B.; SCHETHAUER, B. W.; BURGER, P. C. (1995). Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* **15**: 211-221.
- KLYMKOWSKY, M. W. (1981). Intermediate filaments in 3T3 cells collapse after intracellular injection of a monoclonal anti-intermediate filaments. *EMBO J.* **291**: 249-251.

- KOOCHPOUR, S.; MERZAK, A.; PILKINGTON, G. J. (1995). Extracellular matrix proteins inhibit proliferation, upregulate migration and induce morphological changes in human glioma cell lines. *Eur. J. Cancer* **3**: 375-380.
- KOSAKO, H.; GOTO, H.; YANAGIDA, M.; MATSUZAWA, K.; FUJITA, M.; TOMONO, Y.; OKIGAKI, T.; ODAI, H.; KAIBUCHI, K.; INAGAKI, M. (1999). Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis:cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filament. *Oncogene* **18**: 2783-2788.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LAPING, N. J.; TETER, B.; NICHOLS, N. R.; ROZOVSKY, I.; FINCH, C. E. (1994). Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol.* **1**: 259-275.
- LEHTONEN, E.; LEHTO, V. P.; PAASIVUO, R.; VIRTANEN, I. (1983). Parietal and visceral endoderm differ in their expression of intermediate filaments. *EMBO J.* **2**: 1023-1028.
- LEUNG, C. L.; FLORES, R. L.; LIEM, R. K. H. (1998). The complexity of intermediate filaments in the nervous system. *Subcellular Biochemistry – Intermediate filaments.* **31**: 496-529.
- LIOTTA, L. A. & KOHN, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**: 375-379.
- LUCKENBILL-EDDS, L. (1997). Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res. Rev.* **23**: 1-27.
- MALINDA, K. M.; NOMIZU, M.; CHUNG, M.; DELGADO, M.; KURATOMI, Y.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K.; PONCE, M. L. (1999). Identification of laminin alpha-1 e beta-1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J.* **13**: 53-62.

- MANIOTIS, A. J.; CHEN, C. S.; INGBER, D. E. (1997). Control of the cell and nuclear shape by mechanical stresses transmitted from integrins to the nucleus over direct cytoskeletal interconnections. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**: 849-854.
- MARSZALEK, J. R.; WILLIAMSON, T. L.; LEE, M. K.; XU, Z.; HOFFMAN, P. N.; BECHER, M. W.; CRAWFORD, T. O.; CLEVELAND, D. W. (1996). Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. *J. Cell Biol.* **135**: 711-724.
- MARTUZA, R. L.; MALICK, A.; MAKERT, J. M.; RUFFNER, C. (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* **252**: 854-856.
- MASSOVA, I.; KOTRA, L. P.; FRIDMAN., R.; MOBASHERY, S. (1998). Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* **12**: 1075-1095.
- MATSUZAWA, K.; KOSAKO, H.; AZUMA, I.; INAGAKI, N.; INAGAKI, M. (1998). Possible regulation of intermediate filament protein by Rho-binding kinases. *Subcell. Biochem.* **31**: 423-435.
- MCDONOUGH, W. S.; JOHANSSON, A.; JOFFEE, H.; GIESE, A.; BERENS, M. E. (1999). Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**: 601-611.
- MCLENDON, R. E.; ROBISON, J. S.; CHAMBERS, D. B.; GRUFFERMAN, S.; BURGER, P. C. (1985). The glioblastoma multiforme in Georgia, 1977 – 1981. *Cancer* **56**: 894-897.
- MENDES DE AGUIAR, C. B. N.; GARCEZ, R. C.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. (2002). Undersulfatation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. *Int. J. Dev. Neurosci.* **20**: 563-571.
- MENET, V.; GIMÈNEZ Y RIBOOTTA, M.; CHAUVET, N.; DRIAN, M. J.; LANNOY, J.; COLUCCI-GUYON, E.; PRIVAT, A. (2001). Inactivation of the GLIAL fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J. Neurosci.* **21**: 6147-6158.

- MONTEIRO, M. J.; HOFFMANN, P. N.; GEARHART, J. D.; CLEVELAND, D. W. (1990). Expression of NF-L in both neuronal and nonneuronal cells of transgenic mice: Increased neurofilament density in axon without affecting caliber. *J. Cell Biol.* **111**: 1543-1557.
- MOSSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
- NAKAGAWA, Y.; PERENTES, E.; RUBINSTEIN, L. J. (1986). Immunohistochemical characterization of oligodendrogliomas: an analysis of multiple markers. *Acta Neuropathol.* **72**:15-22.
- NAKATANI, Y.; HORIKOSHI, M.; BRENNER, M.; YAMAMOTO, T.; BESNARD, F.; ROEDER, R. G.; FREESE, E. (1990). A downstream initiation element required for efficient TATA box binding and in vitro function of TFIID. *Nature* **348**: 86-88.
- PEKNY, M.; STANNESS, K.; ELIASSON, C.; BETSHOLTZ, C.; JANIGRO, D. (1998). Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* **22**: 390-400.
- PEKNY, M.; ELIASSON, C.; CHIEN, C. L.; KINDBLOM, L. G.; LIEM, R.; HAMBERGER, A.; BETSHOLTZ, C. (1998b). GFAP-deficient astrocyte are capable of stellation *in vitro* when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Expt. Cell Res.* **239**: 332-343.
- PEKNY, M.; JOHANSSON, C. B.; ELIASSON, C.; STAKEBERG, J.; WALLEN, A.; PERLMANN, T.; LENDAHL, U.; BETSHOLTZ, C.; BERTHOLD, C. H.; FRISEN, J. (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol.* **145**: 503-514.
- POBERESKIN, L. H. & CHADDUCK, J. B. (2000). Incidence of brain tumours in two english counties: a population based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **69**: 464-471.

- PONCE, M. L.; NOMIZU, M.; DELGADO, M. C.; KURATOMI, Y.; HOFFMAN, M. P.; POWELL, S.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H. K.; MALINDA, K. M. (1999). Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma-1 chain. *Cir. Res.* **84**: 688-694.
- POTEN, J & MACINTYRE, E. H. (1968). Long term culture of neuronal and neoplastic human glial. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **74**: 465-486.
- PYTELA, R.; WICHE, G. (1980). High molecular weight polypeptides (270,000--34,000) from cultured cells are related to hog brain microtubule-associated proteins but copurify with intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 4808-4812.
- REMPEL, S. A.; GOLEMBIESKI, W. A.; FISHER, J. L.; MAILE, M.; NAKEFF, A. (2001). SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U-87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins. *J. Neuroo.* **53**: 149-160.
- RUSSELL, D.S.; RUBINSTEIN, L. J. (1989). Pathology of tumours of the nervous system. *Baltimore: Williams & Wilkins.* **Ed 5**: 30-31.
- RUTKA, J. T & SMITH, S. L. (1993). Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acidic protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. *Cancer Res.* **53**: 3624-3631.
- RUTKA, J. T.; HUBBARD, S. L.; FUKUYAMA, K.; MATSUZAWA, K.; DIRKS, P. B.; BECKER, L. E. (1994). Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on the growth, invasion and adhesion of human astrocytoma cells. *Cancer Res.* **54**: 3267-3272.
- RUTKA, J. T.; IVANCHUK, S.; MONDAL, S.; TAYLOR, M.; SAKAI, K.; DIRKS, P.; JUN, P.; JUNG, S.; BECKER, L. E.; ACKERLEY, C. (1999). Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int. J. Devl. Neurosc.* **17**: 503-515.

- RUTKA, J. T.; MULLER, M.; HUBBARD, S. L.; FORSDIKE, J.; DIRKS, P. B.; JUNG, S.; TSUGU, A.; IVANCHUK, S.; COSTELLO, P.; MONDAL, S.; ACKERLEY, C.; BECKER, L. E. (1999b). Astrocytoma adhesion to extracellular matrix: functional significance of integrin and focal adhesion kinase expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**: 198-209.
- RUTKA, J. T.; MURAKAMI, M.; DIRKS, P. B.; HUBBARD, S. L.; BECKER, L. E.; FUKUYAMA, K.; JUNG, S.; MATSUZAWA, K. (1997). Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J. Neurosurg.* **87**: 420-430.
- SARIS, S. (1996). Multidisciplinary approach to malignant gliomas. *Med. Health* **79**: 210-213.
- SCHIFFER, D.; CAVALLA, P.; DUTTO, A; BORSOTTI, L. (1997). Cell proliferation and invasion in malignant gliomas. *Anticancer Res.* **17**: 61-70.
- SCHWARTZ, M. A. & BARON, V. (1999). Interaction between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 197-202.
- SEIFERT, G. J.; LAWSON, D.; WICHE, G. (1992). Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers. *Eur. J. Cell Biol.* **59**:138-147.
- SHAW, G. (1998). *Neurofilaments*. Berlin: Springer-Verlag: 1-287.
- SIN, W. C.; CHEN, X. O.; LEUNG, T.; LIM, L. (1998). Rho-binding kinase α translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. *Mol. Cell Biol.* **18**: 6325-6339.
- STEINER, P. M.; MAREKOV, L. N.; PARRY, D. A. D. (1993). Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J. Biol. Chem.* **268**: 24916-24925.
- STREULI, C. (1999). Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 634-640.

- SUTHERLAND, G. R.; FLORELL, R.; LOUW, D.; CHOI, N. W.; SIMA, A. A. (1987). Epidemiology of primary intracranial neoplasms in Manitoba, Canada. *Can. J. Neurol. Sci.* **14**: 586-592.
- TIMPL, R & BROWN, J. C. (1994). The laminins. *Matrix Biol.* **14**: 275-281.
- TIMPL, R & DZIADEK, M. (1986). Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **29**: 1-112.
- TOWBIN, H.; STAEBELI, T.; GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of the proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **455**: 68-78.
- TRENTIN, A. G. & MOURA-NETO, V. (1995). T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *Neuroreport* **6**: 293-296.
- TRENTIN, A. G.; MENDES DE AGUIAR, C. B. N.; GARCEZ, R. C.; ALVAREZ-SILVA, M. (2003). Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: Effects on astrocyte adhesion. *Glia* **42**: 359-369.
- TRENTIN, A. G.; ROSENTHAL, D.; MOURA-NETO, V. (1995). Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation and proliferation. *J. Neurosci. Res.* **42**: 409-417.
- TRUEB, B.; GROBOLI, B.; SPIESS, M.; ODERMATT, B. F.; WINTERHALTER, K. H. (1982). Basement membrane collagen type IV is a heteropolimer. *J. Biol. Chem.* **257**: 5239-5245.
- TYSNES, B. B.; MAHESPARAN, R.; THORSEN, F.; HAUGLAND, H. K.; PORWOL, T.; ENGER, P. O.; LUND-JOHANSEN, M.; BJERKVIG, R. (1999). Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. *Int. J. Dev. Neurosci.* **17**: 531-539.
- VACCARIELO, M.; JAVAHERIAN, A.; WANG, F.; FUSENIG, N. E.; GARLICK, J. A. (1999). Cell interaction control of the fate of malignant keratinocyte in an organotypic model of early neoplasia. *J. Invest. Dermatol.* **113**: 384-391.

- VALGEIRSDÓTTIR, S.; CLAESSON-WELSH, L.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; HELLMAN, U.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C. H. (1998). PDGF induces reorganization of vimentin filaments. *J. Biol. Chem.* **114**: 12861-12866.
- WERNET, N. (1997). The multiples role of tumor stroma. *Virchows Arch.* **430**: 433-443.
- WICHE, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell Sci.* **111**: 2477-2486.
- WOLF, K.; MAZO, I.; LEUNG, H.; ENGELKE, K.; ANDRIAN, U. H.; DERYUGINA, E. I.; STRONGIN, A. Y.; BRÖCKER, E. B.; FRIEDL, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* **160**: 267-277.
- YOON, M.; MOIR, R. D.; PRAHLAD, V.; GOLDMAN, R. D. (1998). Motile properties of vimentin intermediate filaments network in living cells. *J. Cell Biol.* **10**: 420-428.
- ZHANG, H.; KELLY, G.; ZERILLO, C.; TAWASKI, D. M.; HOCKFIELD, S. (1998). Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion *in vivo*. *J. Neurosci.* **18**: 2370-2376.