

Avaliação do conteúdo de HSP70 no crescimento de esferóides de glioblastomas humanos

FRANCIELLI DA COSTA¹
CAROLINE ZANONI¹
ALINE FOSSÁ¹
GUILHERME FOSSÁ¹
LARISSA PROCÓPIO CORRÊA¹
DANIEL PRETTO SCHUNEMANN²
TEREZA JADVIGA MILASZEWICZ¹
DENISE HEIDRICH FARIA³
ANDRÉA PEREIRA REGNER⁴
IVANA GRIVICICH⁴
ADRIANA BRONDANI DA ROCHA⁵

RESUMO

O glioblastoma multiforme é o tumor maligno mais freqüente do sistema nervoso central e apresenta um prognóstico desfavorável. Devido a sua organização histotípica, a metodologia empregando esferóides se aproxima muito mais das condições fisiológicas do que o cultivo em monocamada. As proteínas de choque térmico (Hsp) têm sua expressão aumentada em situações de estresse e dano celular, podendo estar associada com a malignidade do tumor. Neste trabalho produzimos esferóides a partir de amostras

¹ Acadêmicos do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular

³ Professora do Curso de Biologia/ULBRA

⁴ Professoras do Curso de Medicina/ULBRA e do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

⁵ Professora – Orientadora Curso de Medicina e Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (cpcienciasmedicas@ulbra.br)

de glioblastomas obtidas em ressecções cirúrgicas e caracterizamos quanto a proliferação, morfologia e conteúdo de Hsp70. Os resultados demonstraram aumento do conteúdo de Hsp70 e aparecimento das zonas de necrose. Estes dados sugerem que a Hsp70 está associada à progressão tumoral.

Palavras-chave: glioblastoma, Hsp70, necrose, esferóide, progressão tumoral.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme are, among the others, a devastating of neoplasms. Surgery and radiotherapy, the traditional cornerstones of therapy, provide only a palliative benefit. The three-dimensional co-culture model (spheroid) preserved most of characteristics of the in vivo tumor. Heat-shock proteins (Hsps) synthesis can be increased by cellular insults, such as radiation-induced damage. Inducible Hsp70 has been suggested to be involved in tumor malignant. In the present study, we produced spheroids derived from surgical samples of glioblastoma tumor, and verify the growth rate, morphology and HSP70 content. Our results demonstrated an increased in the Hsp70 content and necrotic areas. Thus, our results suggest that Hsp70 is associated to tumor progression.

Key words: glioblastoma, Hsp70, necrosis, spheroid, tumor progression.

INTRODUÇÃO

Os glioblastomas são tumores altamente malignos, possuem crescimento rápido e podem ocorrer em qualquer localização do sistema nervoso central (SNC). No que concerne ao tratamento, os gliomas têm como primeira linha terapêutica a cirurgia associada a radio e quimioterapia (DA ROCHA et al., 2002). Apesar dos avanços nas técnicas diagnósticas, cirúrgicas, quimioterapia e radioterapia (nos últimos 30 anos), o prognóstico dos pacientes com glioblastoma permanece desfavorável (SANO et al., 1999; STUPP et al., 2002; BRANDES, 2003). Frente a ineficiência das possibilidades terapêuticas disponíveis faz-se necessário pesquisar a biologia tumoral, com o objetivo de descobrir novos alvos terapêuticos.

A investigação do comportamento biológico dos gliomas utiliza como principal ferramenta a

avaliação *in vitro*, através do cultivo de células. Neste aspecto, vários modelos experimentais foram desenvolvidos permitindo a análise da proliferação, migração e invasão das células neoplásicas. Além disso, os modelos *in vitro* permitem o estudo de funções especializadas de tipos específicos de células, que também podem ser analisadas bioquimicamente. De um modo geral, o cultivo celular *in vitro* é um método utilizado para se estudar o comportamento das células sem a interferência das variações sistêmicas, que podem se originar durante a homeostase ou o estresse nos estudos *in vivo* (FRESHNEY, 1994; HARRISON et al., 1997; FEDOROFF & RICHARDSON, 2001; CORCORAN et al., 2003; LANGDON, 2003).

O cultivo tradicional das células de gliomas é realizado em monocamada (BATES et al., 2000). Este modelo de cultivo *in vitro* é repre-

sentado por células com capacidade de adesão e proliferação a um substrato plástico. As células cultivadas podem ser obtidas de um fragmento de tecido, sendo dissociadas mecânica ou enzimaticamente. As células isoladas são inoculadas em frascos ou placas de cultura (FRESHNEY, 1994; HARRISON *et al.*, 1997; FEDOROFF & RICHARDSON, 2001; LANGDON, 2003). Estes cultivos são denominados de culturas primárias (ALBERT *et al.*, 1997). Além do substrato de adesão para que o cultivo possa se desenvolver é necessário adicionar um meio de cultura contendo nutrientes, que incluem: aminoácidos, vitaminas, sais e glicose. Há diversos tipos de meios de cultura com variações em alguns componentes e suas concentrações. Também são acrescentados soros fetais que possuem proteínas, hormônios, fatores de crescimento e minerais. Estes soros podem ser sintetizados, o que pode torná-los específicos para uma determinada célula e sua função (FRESHNEY, 1994; HARRISON *et al.*, 1997; FEDOROFF & RICHARDSON, 2001; LANGDON, 2003).

Ainda que a modalidade de cultivo na forma de monocamada forneça diversas informações a respeito da proliferação e da migração das células, a avaliação bidimensional apresenta nítidas limitações quando comparada a invasão das células malignas *in vivo*. A principal limitação das culturas bidimensionais relaciona-se a impossibilidade da análise das interações intercelulares e das células com a matriz extracelular (FRESHNEY, 1994; BATES *et al.*, 2000). Desta forma, os modelos tridimensionais de agregados celulares (esferóides) são bastante adequados e viáveis sob ponto de vista experimental. Tais modelos proporcionam melhor compreensão da adesão

intercelular e podem apresentar organização histológica comparável ao ambiente do tumor (BATES *et al.*, 2000; DE RIDDER *et al.*, 2000; DESOIZE, 2000; DEL DUCA *et al.*, 2004). Os esferóides mimetizam a estrutura tumoral e algumas das suas propriedades, exibindo gradientes de oxigênio, pH e nutrientes e, além disso, podem apresentar áreas centrais de necrose (BELL *et al.*, 1999; DESOIZE, 2000; GÜNTHER *et al.*, 2003). Neste aspecto, os agregados tridimensionais proporcionam um ambiente equivalente à neoplasia *in vivo* e também podem ser utilizados na avaliação de quimioterápicos e no estudo da resistência à radiação ionizante (FRESHNEY, 1994; BAUMAN *et al.*, 1999; DESOIZE, 2000).

As proteínas de choque térmico (Hsp) pertencem a um grupo de proteínas altamente conservadas que são expressas em resposta a várias formas de estresse celular. Elas também atuam constitutivamente como chaperonas moleculares, sendo fundamentais nos processos de reparo a diferentes tipos de danos e na prevenção da perfeita agregação de proteínas (HERMISSON, 2000). A exposição prévia das células a condições estressantes, não-letais, pode suscitar a síntese de Hsp e proteger contra os efeitos lesivos de novas exposições (MEYER, 1999). Desta forma, é provável que a indução de Hsp70 esteja relacionada a múltiplas funções de citoproteção contra a apoptose e com o aumento de malignidade do tumor (MOSSER, 2000). No presente estudo nós observamos o desenvolvimento de esferóides a partir de amostras de glioblastomas obtidas por ressecção cirúrgica, avaliamos o perfil de crescimento dos esferóides e determinamos o conteúdo de Hsp70 secretado durante o cultivo destes.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção dos Cultivos Celulares e de Esferóides

As células obtidas das ressecções cirúrgicas foram cultivadas em frascos de 25 cm² ou 75 cm² com meio de cultura D-MEM contendo 2% de L-glutamina (p/v) e 10% de FCS. Os cultivos denominados EE e JO2 foram mantidos à temperatura de 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de 95%.

As células foram mantidas em crescimento exponencial através de subcultivo, a cada dois dias, em meio de cultura com antibióticos. Os frascos com células em semiconfluência foram utilizados nos experimentos. As células foram removidas dos frascos de cultura por dissociação mecânica com o auxílio de raspadores plásticos.

Preparação dos Esferóides

Os esferóides de EE e JO2 foram preparados a partir de adaptações do método descrito por GÜNTHER et al. (2003). Para isto, 2x10⁶ células foram adicionadas em placas de cultura cobertas com 0,15% de ágar em D-MEM, após 48 horas de cultivo e mantidas nas condições padrões descritas acima. Os cultivos foram diariamente observados em microscópio invertido *Leica DMIL*.

Avaliação da Cinética de Crescimento dos Esferóides

Para analisar o crescimento dos esferóides ao longo do tempo, esferóides com volume de 200 mm³ coletados sob microscópio invertido, foram

transferidos individualmente para placas de 24 wells cobertas com 0,15% de ágar em D-MEM. Após inoculação dos esferóides foi acrescentado 1 ml de D-MEM em cada well. O volume dos esferóides foi mensurado diariamente durante 20 dias através das imagens obtidas em microscópio invertido. As imagens observadas ao microscópio foram fotografadas, transferidas para o computador e analisadas no software Image J, versão 1.32J.

Análise Histológica

Os esferóides cultivados foram fixados em formol 10% e, após 24 horas, submetidos à desidratação alcoólica ascendente em concentrações de 70%, 80%, 90%, 96% e 100% de etanol. Posteriormente, foram incluídos em parafina e seccionados serialmente na espessura de 5 µm (SUTHERLAND et al., 1971; SUTHERLAND, 1988; DURAND, 1990). As lâminas obtidas a partir dos cortes histológicos foram coradas com Tricômio de Masson, analisadas em um microscópio óptico *Leica CME* e fotografadas em uma câmera digital Sony modelo P-100.

Avaliação do Conteúdo de Hsp70

Os meios de cultivo dos esferóides inoculados em placas de 24 wells cobertas com 0,15% de ágar em D-MEM foram coletados para determinação do conteúdo de Hsp70. As coletas foram realizadas nos dias 1, 2 e 8 de cultivo e analisadas pelo método de ELISA. A proteína total foi quantificada por ensaio colorimétrico segundo Lowry (1951). Os resultados foram expressos em picograma de Hsp70 por micrograma de proteína total.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinética de Crescimento dos Esferóides

A fim de caracterizar o comportamento dos esferóides de EE e JO2 em cultivo, foram realizados experimentos avaliando o padrão de crescimento dos mesmos. Nestes experimentos os esferóides que apresentavam o volume de 200 mm³ foram acompanhados durante 20 dias e mensurados diariamente. Ao observarmos a Figura 1 verificamos que o padrão de crescimento dos esferóides é variável em função da amostra obtida. Os esferóides de EE aumentaram de tamanho até o décimo primeiro dia e sua desintegração foi verificada após esse período. Já os esferóides de JO2 crescem até o décimo sexto dia, e só então os esferóides entram em processo de desintegração. Estas características estão de acordo com as apresentadas por NIRMALA (2001), segundo o qual o volume de crescimento dos esferóides torna-se saturado ao longo do tempo. Estes resultados demonstraram que é possível o desenvolvimento e manutenção destes agregados celulares tridimensionais a partir de amostras de glioblastomas obtidas por ressecções cirúrgicas.

Análise histológica

As análises dos cortes histológicos dos esferóides de EE e JO2, nos dias 2 e 8 de cultivo, apresentaram o padrão relatado pela literatura. Dentre as características de um tumor *in vivo* apresentadas pelo esferóide, verificou-se a manifestação de microrregiões. Segundo a descrição de CORCORAN (2003) estas regiões consistem em uma camada externa de células em proliferação, uma zona intermediária de células

em hipóxia e uma provável área de necrose evidenciada pela presença de diversos núcleos picnóticos (Figura 3A e 3B). Já na Figura 2B e 2D é possível observar que o aumento de matriz extracelular, a multiplicação dos vacúolos e o surgimento das zonas de necrose, a partir do oitavo dia em ambos os esferóides, acompanharam a progressão do cultivo. Nossos resultados estão de acordo com BELL (2001) que ao relatar um terceiro tipo de morte denominado “morte celular vacuolar” descreveu que as células dos esferóides continham grandes vacúolos, os quais possivelmente resultaram da dilatação e fusão de organelas. O citoplasma se apresentou eletrodense e a membrana celular aparentemente intacta.

Conteúdo de Hsp70

A determinação do conteúdo de Hsp70 secretado no meio de cultivo (Figura 4), revelou um incremento significativo no dia 8 de cultivo, tanto nos esferóides de EE quanto nos de JO2. Pode-se sugerir, que o aumento ocorrido na secreção desta proteína esteja associado com o aumento de malignidade do tumor. Embora os mecanismos pelos quais a indução no conteúdo de Hsp70 promova citoproteção contra a apoptose permaneça desconhecido, estudos demonstraram que a proteína Hsp70 pode estar envolvida na regulação mitocondrial da rota de apoptose (BRONDANI DA ROCHA, 2004). A Hsp70 é capaz de inibir a apoptose evitando a liberação do citocromo c pela mitocôndria. Este evento pode resultar da modulação da atividade ou localização de membros proapoptóticos e antiapoptóticos da família *bcl-2* (MOSSER, 2000). Neste cenário, a Hsp70 apresentaria inibição da apoptose por prevenção da ativação das procaspases 9 e 3, para o complexo apoptótico, com isso prevenindo a formação do grupamento funcional do complexo apoptossômico (JOLLY, 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o conteúdo de Hsp70 foi proporcional a progressão de cultivo. Da mesma forma as

análises histológicas revelaram que o incremento de Hsp70 acompanhou o aparecimento de zonas de necrose nos esferóides. Estes dados sugerem que existe uma associação entre o conteúdo de Hsp70 com a progressão tumoral.

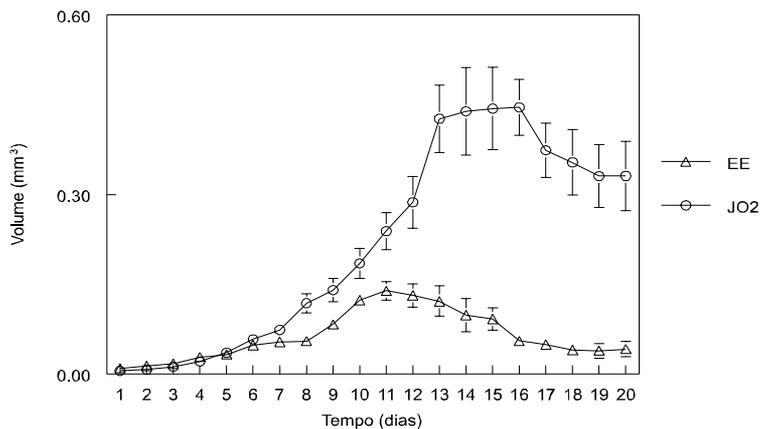


Figura 1 - Curvas de crescimento dos esferóides de EE e JO2 em substrato ágar 0,15%. Os resultados expressam as médias + desvio padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata.

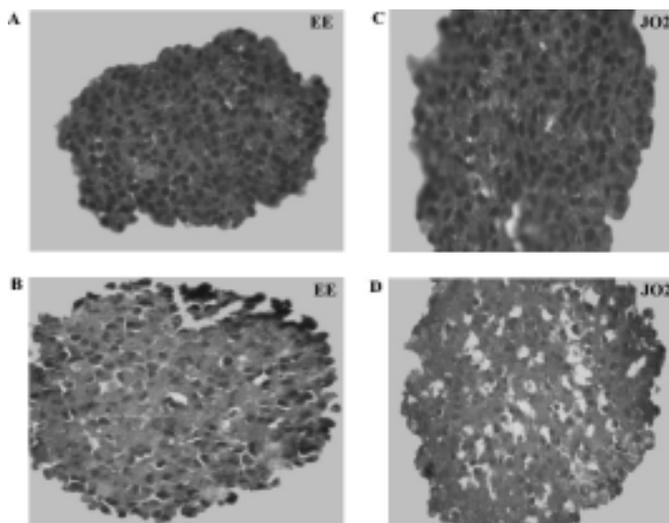


Figura 2 - Fotografia de cortes histológicos dos esferóides de EE e JO2. As análises foram realizadas aos 2 (A, C) e 8 (B, D) dias de cultivo. Células coradas com Tricômio de Masson. Aumento de 800X.

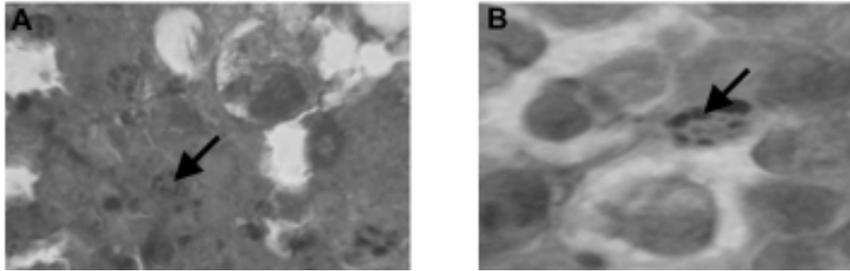


Figura 3 - Fotografia de cortes histológicos da região central dos esferóides JO2 (A) e EE (B) mostrando células em processo necrótico. Núcleos picnóticos (setas). Células coradas com Tricômio de Masson. Aumento de 800X.

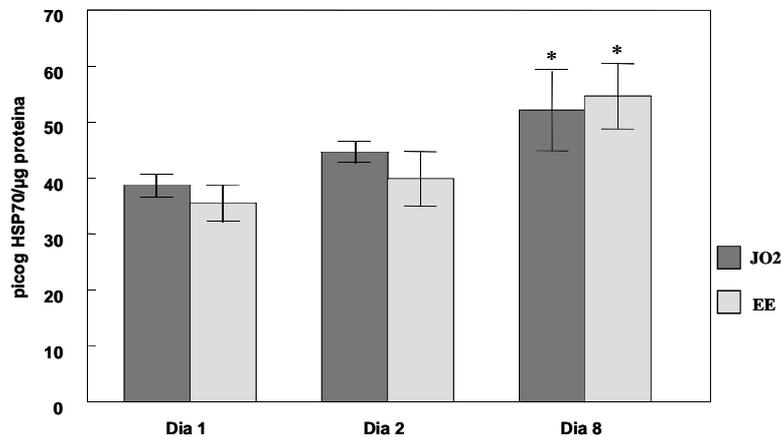


Figura 4 - Conteúdo de Hsp70 secretado no meio em 1, 2 e 8 dias de cultivo dos esferóides de EE e JO2. Os valores indicam as médias + desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. Como as células são estudadas. In: ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 4, p.139-189.

BATES, R. C.; EDWARDS, N. S.; YATES, J. D. Spheroids and cells survival. **Critical**

Reviews in Oncology and Hematology, v.36, p.61-74, 2000.

BAUMAN, G. S. et al. Effects of radiation on a three-dimensional model of malignant glioma invasion. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.17, p.643-651, 1999.

BELL, H. S. et al. Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth:

experimental studies with glioma spheroids in collagen gels. **Journal of Neurosurgery**, v. 91, p. 986-996, 1999.

BELL, H. S. et al. The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems. **Neuropathologist and Applied Neurobiology**, v.27, p.291-304, 2001.

BRANDES A. State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors. **Seminars in Oncology**, v.30, p.4-9, 2003.

CORCORAN, A. et al. Evolution of the brain tumour spheroid model: transcending current model limitations. **Acta Neurochirurgica**, v.145, p. 819-824, 2003.

DE RIDDER, L.; CORNELISSEN, M.; DE RIDDER, D. Autologous spheroid culture: a screening tool for human brain tumour invasion. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v.36, p.107-122, 2000.

DEL DUCA, D.; WERBOWETSKI, T.; DEL MAESTRO, R. F. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. **Journal of Neuro-Oncology**, v.67, p.295-303, 2004.

DESOIZE, B. Contribution of three-dimensional culture to cancer research. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**, v.36, p.59-60, 2000.

FEDOROFF, S.; RICHARDSON, A. **Protocols for neural cell culture**. 3.ed. Totowa: Humana Press. 2001. 384p.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.

GÜNTHER, W. et al. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. **British Journal of Cancer**, v.88, p.463-469, 2003.

HARRISON, M. A.; RAE, I. F.; HARRIS, A. **General techniques of cell culture**. Handbooks in practical animal cell biology. 1.ed. Cambridge: Cambridge University, 1997. 172p.

HERMISSON, M. et al. Expression and functional activity of heat shock proteins in human glioblastoma multiform. **Neurology**, v.54, p.1357-1365, 2000.

LANGDON, S. P. **Cancer cell culture: method and protocols** (Methods in molecular medicine). 1.ed. Totowa: Humana Press, 2003. 368p.

MEYER, T. N.; SILVA, A. L. da. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.45, n.2, p.181-188, 1999.

MOSSER, D. D. et al. The Chaperone function of hsp70 Is required for protection against stress-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, p.7146-7159, oct. 2000.

NIRMALA, C. et al. Growth characteristic of glioblastoma spheroids. **International Journal of Oncology**, v.19, p.1109-1115, 2001.

ROCHA, A. B. et al. Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? **Oncologist**, v.7, n.1, p.17-33, 2002. Review.

ROCHA. A. B. da et al. Radioresistence is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. **International Journal of Oncology**, v.25, n.3, p.777-785, sept. 2004.

SANO, T. et al. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. **Cancer Research**, v.59, p.1820-1824, 1999.

STUPP, R. et al. Promising survival for

patients with newly diagnosed glioblastomas multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.1375-1382, 2002.