

# Efeitos *in vitro* do ácido retinóico em células de glioblastoma

## Effects *in vitro* of the retinoic acid in glioblastoma cells

SÍLVIA LIMA COSTA<sup>1</sup>, DANIELLE RICHE<sup>2</sup>, CHRISTIANE FAGES<sup>3</sup>, CECILÉ ROCHETTEEGLY<sup>4</sup>,  
MARCIEENNE TARDY<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Professora de Bioquímica. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

<sup>2</sup> Pesquisadora. INSERM V 421. Faculté de Médecine. Université Paris XII

<sup>3</sup> Técnico. INSERM V 421. Faculté de Médecine. Université Paris XII

<sup>4</sup> Pesquisador. Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire. Illkirch, França

<sup>5</sup> Professora de Bioquímica. INSERM V 421. Faculté de Médecine. Université Paris XII

### Resumo

Os gliomas malignos são tumores muito infiltrantes, cujas células proliferam rapidamente, e apresentam um prognóstico muito reservado. Neste estudo, investigamos o efeito em potencial do ácido retinóico (AR) sobre a linhagem de células de glioblastoma multiforme humano GL-15. A exposição a uma única dose de AR (1-10 mM) inibiu a proliferação celular, induziu uma diferenciação transitória e, finalmente, conduziu estas células à apoptose. Observamos que as células GL-15 expressam os isotipos dos RARs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e que as isoformas RAR $\alpha$ 1/2, RAR $\beta$ 2 e RAR $\gamma$ 2 são induzidas pelo AR. Estes resultados sugerem que a relação entre a expressão das diferentes isoformas de RARs pode ser um elemento fundamental para a indução seja de uma diferenciação completa, seja de apoptose das células de glioblastoma, e que o uso de ligantes específicos a cada isotipo de receptor pode vir a ser um elemento importante para terapias futuras de gliomas.

### Palavras-chave

Ácido retinóico, glioma, apoptose, diferenciação, RAR

---

Prof<sup>a</sup> Sílvia Lima Costa

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular

Departamento de Biofunção

Instituto de Ciências da Saúde

Universidade Federal da Bahia

Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela

40.110-100 Salvador, Bahia, Brasil

e-mail: labviro@svn.com.br

## Introdução

Os glioblastomas (WHO Grau IV) são os tumores cerebrais mais freqüentes e mais malignos entre os neoplasmas do SNC (KLEIHUS; BURGER; SCHEITHAUER, 1993; BURGER; SCHEITHAUER, 1994). A eficácia dos tratamentos convencionais dos glioblastomas, que compreende, geralmente, cirurgia associada com radioterapia e quimioterapia com compostos citotóxicos, é muito limitada e apresenta, em média, um aumento da sobrevivência dos pacientes de somente alguns meses (HILDEBRAND et al., 1997; DEANGELIS et al., 1998). Estudos da biologia do câncer revelam que existe freqüentemente uma relação inversa entre o grau de diferenciação de um tumor e o seu potencial de agressividade (WARRELL JR., 1997). Nesse sentido, os agentes que potencialmente são capazes de induzir diferenciação celular constituem uma alternativa aos tratamentos convencionais com compostos citotóxicos. Numerosos estudos científicos e clínicos têm mostrado que os retinóides, e particularmente o ácido retinóico (AR), são um grupo de substâncias que possuem tal propriedade de induzir diferenciação e constituem, assim, uma alternativa em potencial para o tratamento de diversas formas de câncer (CHEN et al., 1991; SMITH et al., 1992; LOTAN, 1996).

O AR é um derivado metabólico natural da vitamina A (retinol) que exerce efeitos importantes durante o desenvolvimento embrionário de vertebrados (para revisão, ver GUDAS; SPORN; ROBERTS, 1994). No entanto, os mecanismos pelos quais o AR modula o crescimento e a diferenciação de células normais e malignas não está ainda totalmente elucidado. Vários estudos têm proposto que, após a ligação no citoplasma com pequenas proteínas de alta afinidade pelo AR (CRABPs), o AR exerce seus efeitos biológicos através de duas famílias de ativadores de transcrição dependentes do ligante: os receptores do ácido retinóico (RARs), ativados pelo *trans*-ácido retinóico (tAR) e pelo *9-cis*-ácido retinóico (9C-AR), e os receptores X de retinóides (RXRs), ativados somente pelo 9C-AR. Estes receptores já foram bem caracteriza-

dos nas células humanas. Eles pertencem à superfamília dos receptores dos esteróides, dos hormônios tireoidianos e da vitamina D e apresentam três isotipos,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Estes isotipos são produtos de genes diferentes, e cada um apresenta um perfil de expressão espaço-temporal diferente durante o desenvolvimento embrionário e no tecido adulto que varia em função do tipo celular (MANGELSDORF; UMESONO; EVANS, 1994; KASTNER; MARK; CHAMBON, 1995; CHAMBON, 1996), o que sugere que cada receptor possa induzir funções diferentes e específicas (KASTNER; MARK; CHAMBON, 1995; BOYLAN et al., 1995).

Nas células tumorais, a presença de um ou mais dos isotipos dos receptores RARs e RXRs, e a regulação destes isotipos pelos retinóides pode ser essencial para induzir apoptose, obter um efeito diferenciador e/ou anti-proliferativo nessas células. Estudos recentes têm revelado que a indução pelo AR do receptor RAR $\alpha$  nas células leucêmicas da linhagem HL-60 estava associada à indução de diferenciação, enquanto a indução de RXR $\alpha$  nessas mesmas células estava associada à indução de apoptose (NAGY et al., 1995; MEHTA et al., 1996). Em contraste, nas células leucêmicas da linhagem PLB-985, a apoptose foi induzida pelo AR somente com a co-estimulação de RAR e RXR (MONCZAK et al., 1997). Tem sido também sugerido que o receptor RAR $\gamma$  modula a diferenciação induzida pelo AR em células SqCC/Y1 de carcinomas escamosos de cabeça e pescoço (ORIDATE et al., 1996), e ainda que o receptor RXR $\alpha$  é essencial para ambos os efeitos antiproliferativo e apoptótico nas células F9 de carcinoma embrionário (CLIFFORD et al., 1996). Finalmente, uma indução do receptor RAR $\alpha$  nas células LA-N-5 de neuroblastoma foi observada após tratamento com o AR (WUARIN et al., 1994).

Assim, este estudo foi empreendido visando caracterizar a sensibilidade de uma linhagem glioblastoma multiforme humano ao AR. Nós observamos que o AR induz uma inibição da proliferação, uma diferenciação que é transitória e apoptose nas células GL-15, e também que

a expressão dos RARs, que é distintamente modulada pelo AR, pode ser um elemento desencadeador destes efeitos nessas células.

## Materiais e métodos

### Linhagem de células e cultura

As células GL-15 (BOCCHINI et al., 1991) são derivadas de glioblastoma multiforme humano. As células cresceram em placas de cultura (Corning), em um meio composto de DMEM (meio Dulbecco)/MEM (Meio Essencial Mínimo de Eagle) (1/1, v/v), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e em presença de 100 UI/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina, 7 mM de glicose, 2 mM de glutamina e 0,011 g/l de piruvate. As células GL-15 são derivadas de cerca de 100 passagens a partir do tumor primário.

### Os retinóides

O ácido retinóico (AR) utilizado é o *trans* (*t*-AR) (Sigma). Ele é obtido sob a forma de pó e é dissolvido no dimetilsulfoxido (DMSO) sob a forma de uma solução estoque a 3 mM guardada na obscuridade a -20°C. As diluições finais de 1 nM, 1 µM, 5 µM e 10 µM foram obtidas no momento do tratamento diluindo-se a solução estoque no meio de cultura.

### Teste de proliferação celular

A proliferação foi estudada pela incorporação de <sup>3</sup>H-timidine. A <sup>3</sup>H-timidine (1 µCi/ml) foi adicionada ao meio de cultura 5 h antes do final de cada experiência. Após eliminação do meio de cultura e lavagem com PBS, as células foram lisadas na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e o ADN foi precipitado com o ácido tricloroacético (ATC) (concentração final de 5%), sobre o gelo, durante 45 minutos. Cada amostra foi filtrada, e o ADN precipitado foi retido sobre filtros GF/A (Millipore), e a radioatividade da fração insolúvel em ATC foi contada em um contador de cintilação β. Os resultados foram expressos em termos de percentagem de incorporação de timidina nas células tratadas em relação à incorporação dos controles não tratados.

### Detecção da apoptose

Dois protocolos foram adotados para identificar a apoptose nas células de glioblastoma tratados com o AR: a marcação pela Anexina V e a coloração do núcleo. A detecção das fosfatidil-serinas nos folhetos externos das membranas das células em estágios precoces de apoptose foi realizada utilizando o *kit* Annexin-V-Alexa TM 589, de acordo com as instruções do fabricante. Após fixação das células aderentes com metanol a -20°C, a condensação e/ou fragmentação do núcleo das células em apoptose foi detectada pela coloração por 5 min com o corante fluorescente Hoechst 33258 (Sigma) a uma concentração de 5 mg/ml em PBS. A percentagem de núcleos em apoptose foi determinada após contagem de, no mínimo, 1.000 células por experimento.

### Imunocitoquímica

As células controle e as tratadas com o AR foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com metanol à -20°C, incubadas com solução de anticorpos policlonais de coelho anti-GFAP (1/200, Dako) e, então, incubadas com solução de anticorpos anti-IgG de coelho conjugado com TRITC (1/400, Biomakor-3359), tendo sido, então, analisadas por microscopia de fluorescência.

Para a detecção dos receptores RARα e RARβ, as células GL-15, previamente fixadas com metanol a -20°C, foram mantidas durante 1 h em um tampão PBS de hidratação/bloqueio contendo 0,1% de ASB, 0,2% de gelatina, 0,1% de Triton X-100. As células foram então incubadas durante 12 h, a 4°C, com anticorpos policlonais anti-RARα (1/100, Santa Cruz) ou anticorpos policlonais anti-RARβ (1/100, gentilmente cedido pelo Dr. Pierre Chambom). Após três lavagens com PBS contendo 0,1% de ASB, 0,2% de gelatina, 0,1% de Triton X-100, e outra lavagem com PBS contendo 0,1% de ASB, 0,2% de gelatina, as células foram incubadas, durante 1 h, à temperatura ambiente, com anticorpos de carneiro anti-IgG de coelho conjugados ao TRITC (1/400, Biomakor-3359) em PBS, contendo 0,1% de ASB, 0,2% de gelatina, 0,1% de Triton X-100. Finalmente, as

células foram extensivamente lavadas com PBS, contendo 0,1% de ASB, 0,2% de gelatina, 0,1% de Triton X-100, e com PBS contendo 0,1% de ASB, 0,2% de gelatina, e analisadas por microscopia de fluorescência.

#### Western blot

As células foram lavadas duas vezes com PBS e as proteínas foram recuperadas por lise celular a frio com um tampão desnaturante composto de 4 M de uréia, 2% (w/v) de SDS, 2 mM de EGTA, 62,5 mM de Tris-HCL pH 6,8, 0,5% de Triton X-100, 1% de NP40, 1 mM de PMSF, 0,5 mM de vanadato de sódio, 1 mg/ml de aprotinina, 1  $\mu$ M de leupeptina, 1  $\mu$ M de pepstatina, 0,1  $\mu$ M de iodoacetamina, 1  $\mu$ M de benzamidina, 10  $\mu$ M de N-etilmaleimida (NEM) e 10 mU/ml de  $\alpha$ 2-macroglobulina. As suspensões protéicas foram, então, homogeneizadas com um *potter* Thomas, e a concentração de proteínas foi determinada pelo *kit* BSA Protein Assay (PIERCE-INTERCHIM).

Após a adição de 10% de glicerol, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 5% de azul de bromofenol às amostras, e desnaturação pelo calor (100°C durante 5 min), 5  $\mu$ g de proteínas de cada amostra foram separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), constituído por um gel de concentração a 4% e um gel de separação a 10%, e transferidas para membranas de nitrocelulose (BIO-RAD). Após saturação dos sítios não específicos com leite desnatado em pó a 5% (Glória) em TBS-T (Tris Buffered Saline contendo 0,1% (v/v) de Tween 20), as membranas foram incubadas com anticorpos policlonais de coelho anti-GFAP (1/10.000, DAKO, Dinamarca), durante 12 h a 4°C, diluídos no TBS-T contendo 5% de leite desnatado. Após lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-IgG conjugados com uma peroxidase diluídos no TBS-T (1/5.000) durante 1 h à temperatura ambiente. Após lavagens com TBS-T as proteínas foram reveladas pelo sistema ECL Plus (Enhanced Chemio Luminescence, Amersham), de acordo com as instruções do fabricante, e as membranas foram expostas a fil-

mes fotossensíveis (Hyperfilm MP, Amersham). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria.

#### Northern blot

O ARN total das células GL-15, em condições de controle e expostas a 1-5  $\mu$ M de AR durante 24 h, foi extraído pelo método do TRIZOL Reagent (GIBCO-BRL), de acordo com as instruções do fabricante. Vinte microgramas de ARN foram desnaturados pelo calor e separados por eletroforese em gel de agarose contendo 0,8% de formaldeído. Após migração, os ARNs foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond C, Amersham) em um tampão 20x SSC (Saline Sodium Citrate Buffer), durante a noite. As membranas foram pré-hibridizadas a 42°C durante 4 h com a solução de pré-hibridização (50% de formamida, 5x SSC, 5x Denhardt, 0,1% de SDS, 1 mM de EDTA pH 8, 10 mM de tampão fosfato pH 6,5 e 100 mg/ml de ADN de esperma de salmão), e hibridizadas durante a noite a 42° (na mesma solução de pré-hibridização) e em presença de sondas de ADNc de RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  e RAR $\gamma$  (gentilmente cedidas pelo Dr. Pierre Chambom), previamente marcadas com o  $^{32}$ P (0,5-1 x 10<sup>9</sup> cpm/ $\mu$ g de ADNc). As membranas foram então lavadas duas vezes durante 15 min à temperatura ambiente com 2x SSC contendo 0,1% de SDS, seguindo-se duas lavagens a 45°C, de 30 min cada, com solução de 0,1x SSC contendo 0,1% de SDS. As membranas foram expostas a filmes de radiografia (Hyperfilm MP-Amersham) a -70°C durante 72 a 96 h. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria.

#### Reação de polimerização em cadeia pela transcriptase reversa: RT-PCR

Para o RT-PCR, o ARN total das células GL-15 foi extraído pelo método do guanidino tiocianato (TANEJA et al, 1997). A quantidade total de ARN (2  $\mu$ g) utilizada para cada PCR a partir dos ADNc recém-sintetizados foi normalizada com o transcrito de 36B4, que não é sensível ao tratamento com os retinóides. As condições de incubação foram as seguintes: tam-

pão PCR 1x [20mM Tris HCl pH 8,4, 50 mM KCl], 1 mM dNTP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 M DTT, 2,5 U/ml de Taq Polimerase. Os *primers* utilizados para RAR $\alpha$ 1, RAR $\alpha$ 2, RAR $\beta$ 2, RAR $\gamma$ 1, RAR $\gamma$ 2 e  $\beta$ actina foram: 5'-AGTTAGTGGATATAGCACAC-3' e 5'-CTGAGCTGTTGTTCGTAGT-3' para RAR $\alpha$ 1; 5'-AACCCCTTCCTAGTGGTGGGA-3' e 5'-TTGCTCCAGGAGAAGGGGCT-3' para RAR $\alpha$ 2; 5'-GAATGGCAGCATCGGCACAC-3' e 5'-GCTCTCTGTGCATTCTTGCT-3' para RAR $\beta$ 2; 5'-CTCCGCCTTTGCAGATGCTG-3' e 5'-TTGCCCAGCTGGCAGAGCGA-3' para RAR $\gamma$ 1; 5'-TGTTTTCGCCGGACTTGAATC-3' e 5'-TTGCCCAGCTGGCAGAGCGA-3' para RAR $\gamma$ 2; e 5'-GCGCTCGTCGTCGACAACGG-3' e 5'-CAGCCTGGATAGCAACGTA-3' para a  $\beta$ actina. A fim de verificar se as amplificações do ARN estavam em uma escala linear, alíquotas de cada produto de PCR foram recolhidas entre os ciclos 15 e 25, em função do gene analisado. Após a reação de PCR, as alíquotas de cada fração sofreram eletroforese em gel de agarose a 1,5% e foram transferidas para membranas Hybond-N (Amershan). As bandas de RT-PCR foram testadas com as sondas radioativas dos oligonucleotídeos específicos aos isotipos dos RARs e, então, foram analisadas por auto-radiografia.

### Análise estatística dos resultados

Os valores médios dos resultados dos diferentes métodos de análise foram comparados com base na distribuição de Student. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando  $p \leq 0,01$ , utilizando os coeficientes de confiabilidade bilaterais.

## Resultados

As células da linhagem de glioblastoma multiforme humano GL-15 reagiram ao tratamento pelo AR com alterações nas suas taxas de proliferação, e alterações morfológicas e bioquímicas, em função da concentração de AR adotada e o tempo de exposição.

### O AR altera a proliferação das células GL-15

No que diz respeito à ação sobre a proliferação celular, representada pelos níveis de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina, observamos, ao termo da aplicação de AR, em uma faixa de concentração entre 0,1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M (FIG. 1), que o AR apresenta dois efeitos opostos, que variam em função da concentração adotada.

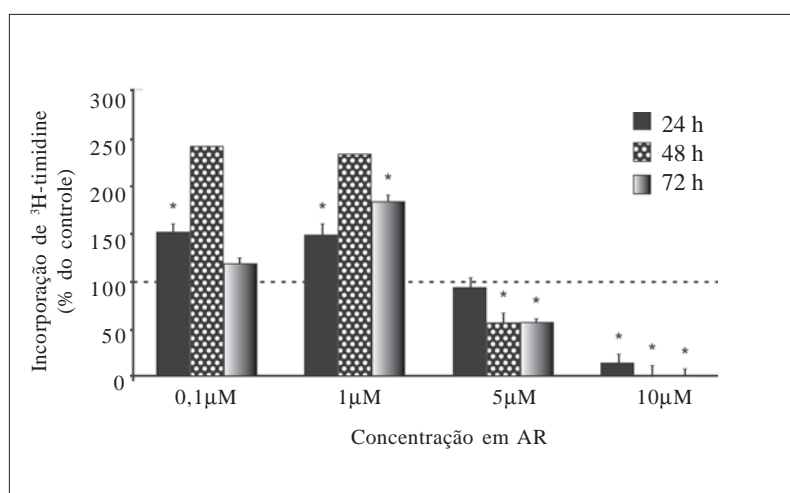


FIGURA 1 - Ação do ácido retinóico (AR) sobre a proliferação das células da linhagem de glioblastoma GL-15. Estudo em função da concentração e do tempo de contato. Os resultados são expressos em porcentagem de <sup>3</sup>H-timidina incorporada nas células tratadas com o AR em relação à incorporação de <sup>3</sup>H-timidina nas células controle, que são consideradas como 100%. (n=4 e \*  $p < 0,01$ ).

As células GL-15 confluentes em condições de controle incorporam a  $^3\text{H}$ -timidina a uma razão de 120.000 cpm/min. Ao termo de 24 h de exposição ao AR nas concentrações entre 0,1 e 1  $\mu\text{M}$ , observamos um aumento de  $50\% \pm 6,3$  nos níveis de incorporação de timidina em relação ao controle não tratado. Após 48 h de incubação, este aumento na incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina é mais importante e atinge  $142\% \pm 4,21$  dos valores do controle, desde a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  em AR. Este valor permanece muito elevado na concentração de 1  $\mu\text{M}$  em AR, mas decresce após 72 h de tratamento.

Nas concentrações farmacológicas mais elevadas, situando-se entre 1 e 10  $\mu\text{M}$ , observamos uma diminuição na incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina, que não é mais do que  $55\% \pm 1,8$  do valor do controle após 48 h de tratamento com 5 mM de AR. Uma inibição maciça da incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina pelas células GL-15 é observada na presença de 10 mM de AR desde 24 h de tratamento.

#### O AR induz apoptose nas células GL-15

No sentido de determinar se o AR induz apoptose nas células GL-15, dois parâmetros

independentes foram adotados: a detecção de fosfatidil-serinas no folheto externo das membranas das células apoptóticas pela Anexina V, e a coloração do ADN pelo agente intercalante Hoechst 33258. A FIG. 2 mostra que a ligação das fosfatidil-serinas membranares à Anexina V nas culturas de células GL-15 não tratadas é indefectível (FIG. 2 A), enquanto cerca de 15% das células tratadas durante 6 h com 10  $\mu\text{M}$  de AR mostram uma marcação positiva (FIG. 2 B), indicando uma indução precoce pelo AR de apoptose nestas células. Após 72 h, observamos, através da coloração pelo corante Hoechst, que, ao contrário das células em condições de controle (FIG. 2 C), cerca de 40% das células GL-15 em contato com 10  $\mu\text{M}$  AR mostram sinais da apoptose, como a condensação e fragmentação da cromatina, e formação dos corpos apoptóticos (FIG. 2 D).

#### O AR induz alterações morfológicas e modula a expressão da proteína GFAP nas células GL-15

A análise imunocitoquímica revela que as células GL-15 em confluência apresentam uma forma bipolar e uma marcação heterogênea da proteína majoritária do gliofilamento GFAP

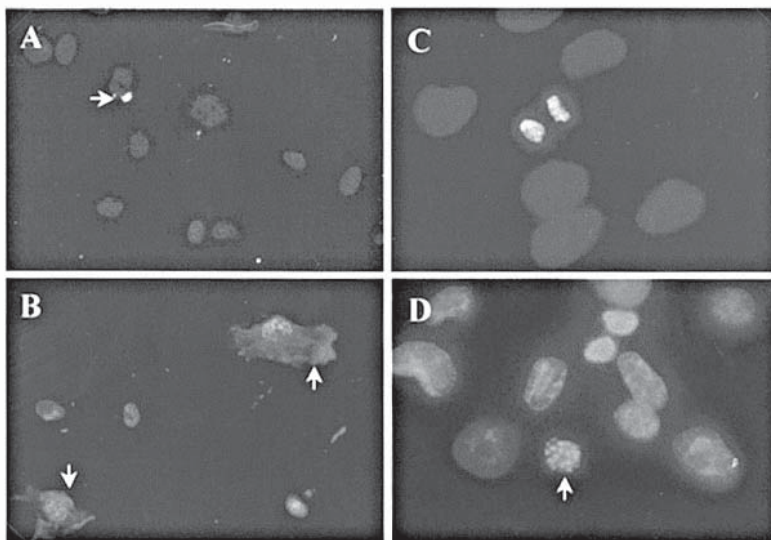


FIGURA 2 - Evidência da apoptose induzida pelo ácido retinóico (AR) nas células GL-15. As fosfatidil-serinas (flechas) nos folhetos externos das membranas das células em condições de controle (A) (fracamente marcadas) e das células tratadas durante 6 h com 10  $\mu\text{M}$  de AR em estado precoce de apoptose (fortemente marcadas) são evidenciadas pela Anexina V. (Obj. x20). Contrariamente a células em condições de controle (C), a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos (flechas) são evidenciados pelo corante Hoechst 33258 nos núcleos das células GL-15 tratadas durante 72 h com 10  $\mu\text{M}$  de AR. (Obj. x40).

(Glial Fibrillary Acid Protein), que se limita a uma subpopulação de células (FIG. 3). O tratamento das células GL-15 durante 48 h com 1-5  $\mu\text{M}$  de AR induz alterações morfológicas das células positivas para a GFAP (FIG. 3 B e C). Estas células parecem mais poligonais e multipolares. Este aspecto é transitório e desaparece após 72 h. As células GL-15 em contato com 10  $\mu\text{M}$  de AR, após 48 h, começam a

apresentar uma retração dos prolongamentos celulares e uma contração do citoplasma, e a GFAP aparece concentrada na região perinuclear.

Quando analisados por Western blot, os níveis da GFAP decrescem nas células GL-15 após 48 h de contato com o AR em concentrações entre 10 nM e 10  $\mu\text{M}$  (FIG. 4) para valores que variam entre 50 e 33% dos valores dos controles.

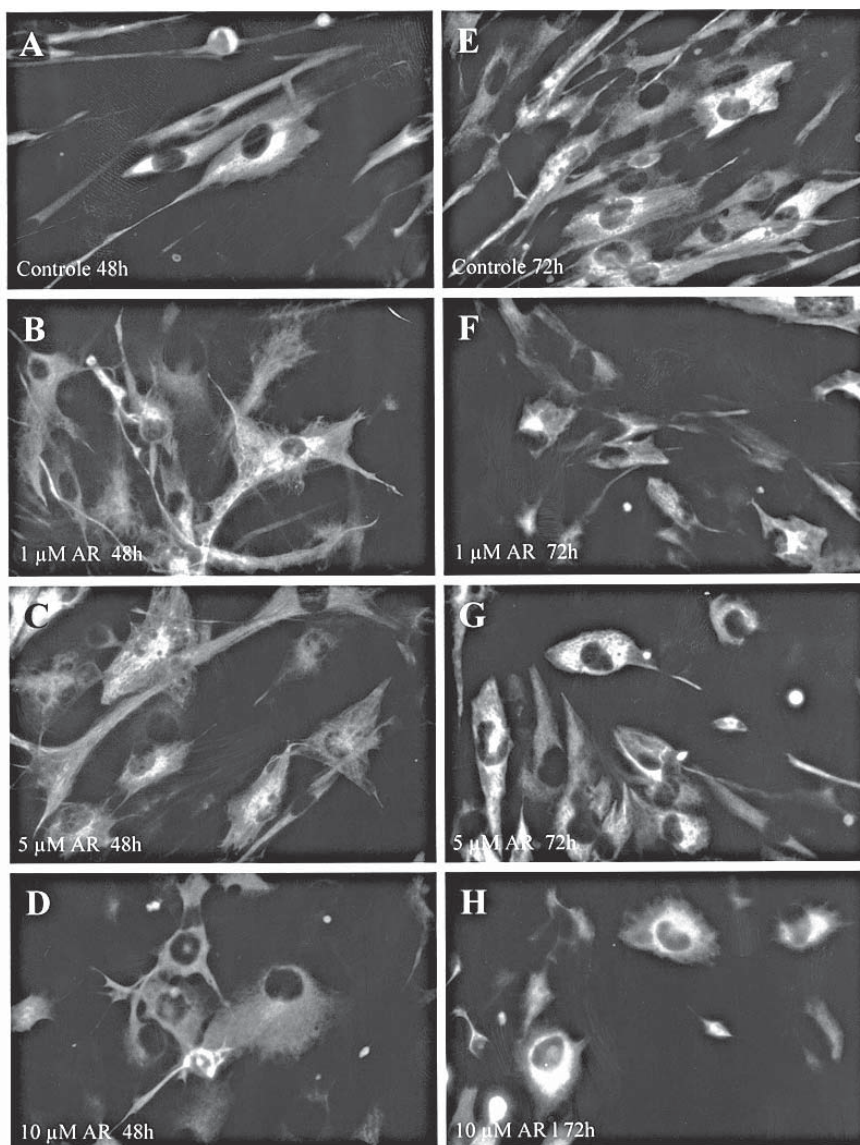


FIGURA 3 - Marcação por imunofluorescência da proteína GFAP. As células GL-15 foram cultivadas em condições de controle (A e E) ou tratadas com diferentes concentrações de AR durante 48 h (coluna da esquerda) e em 3 dias (coluna da direita): 1  $\mu\text{M}$  de AR (B e F); 5  $\mu\text{M}$  de AR (C e G); 10  $\mu\text{M}$  de AR (D e H). (Obj. x40). Nota-se que o tratamento com o AR alterou a morfologia e a marcação da GFAP após 48 h de tratamento nas concentrações de 1-5  $\mu\text{M}$  (B, C), enquanto que 10  $\mu\text{M}$  de AR (D) ou 3 dias de tratamento com 5-10  $\mu\text{M}$  de AR induziram uma regressão das células GL-15 a um aspecto morfológico menos diferenciado.

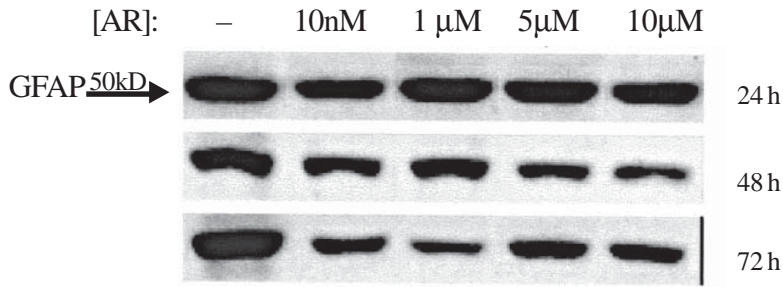


FIGURA 4 - Análise por Western blot da expressão da proteína GFAP nas células GL-15 em condições de controle ou tratadas com 10 nM a 10  $\mu$ M de AR durante 24h, 48 h e 72 h. As bandas correspondem a uma experiência representativa entre quatro.

#### Os RARs são expressos nas células GL-15 e induzidos pelo AR

A expressão dos receptores do AR (RARA, RARb e RARg) foi analisada em nível transcricional e pós-transcricional nas células GL-15, em condições de controle e após o tratamento com doses crescentes de AR. A imunomarcação ilustra, no núcleo das células GL-15, a presença das proteínas receptoras RARA e RARb (FIG. 5). A análise por Northern blot evidencia, nas células GL-15, dois transcritos de ARNm de RARA, RARA1 de 4,4-kb, e RARA2 de 3,5-kb, cujas transcri es são amplificadas após 24 h pelo AR, desde a concentra o de 10 nM (FIG. 6 A). Um máximo de indu o   observado na concentra o

de 5 mM em AR. Um transcrito de ARNm de 2,8-kb de RARb2   também expresso e induzido pelo AR após 24 h de tratamento, com um máximo de indu o entre 10 nM e 5 mM de AR (FIG. 6 B). A análise por Northern blot não foi suficientemente sensível para detectar a expressão dos dois transcritos dos ARNm de RARA. A análise por RT-PCR confirma a indu o pelo AR dos transcritos RARA1/2 e RARb2 nas células GL-15 e evidencia a expressão constitutiva dos isotipos RARg1 (mais fortemente expressa) e RARg2 nas células GL-15, bem como a indu o de RARg2 pelo AR (FIG. 7).

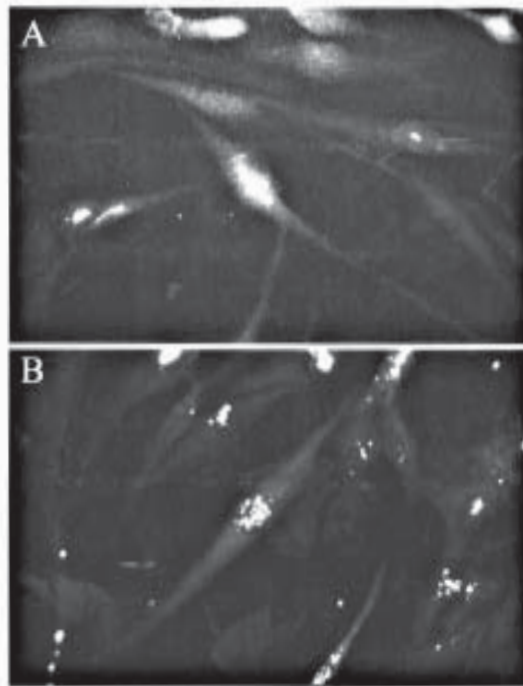


FIGURA 5 - Marca o por imunofluorescência das proteínas RAR  (A) e RAR  (B) nas células GL-15.



## Discussão e conclusões

Dentro de uma perspectiva de ação terapêutica, este estudo analisou, *in vitro*, a eficácia de ação do AR sobre uma linhagem de células derivadas de um glioblastoma multiforme humano. Este estudo foi proposto após investigações clínicas que revelaram que o AR apresentava resultados positivos ainda que parciais e heterogêneos no tratamento de gliomas recidivantes (DEFER et al., 1997).

Nossos resultados mostram que a eficiência do AR no que diz respeito à indução de diferenciação das células GL-15 é parcial, mas que é muito mais importante no que diz respeito à inibição da proliferação celular e à indução de apoptose. A inibição da proliferação somente foi significativa quando o AR foi usado em doses fortes, entre 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Algumas alterações morfológicas associadas a esta inibição da proliferação celular foram constatadas: as células retraíram os prolongamentos celulares, e a marcação da GFAP ou se limitou à região perinuclear ou declinou. A redução da GFAP, proteína implicada nos mecanismos de transporte do núcleo para o citoplasma, pode alterar as funções celulares. Esta etapa pode se revelar como crítica e conduzir as células para o processo de apoptose. Uma redução similar nos níveis da GFAP foi verificada por Chiesa et al. (1998) nas células astrogliais em apoptose após privação de cálcio. Um conflito entre os sinais de proliferação e de diferenciação, capazes de induzir uma regulação positiva ou negativa de genes inapropriados, poderia induzir nas células uma cascata de eventos favoráveis à apoptose (BAUDET et al., 1998). Assim, nossos resultados reforçam a idéia de que os retinóides apresentam sérios efeitos anti-tumorais, relacionados com a capacidade destas moléculas em induzir uma diferenciação transitória, conduzindo as células para a apoptose (ATENCIA et al., 1994; CLIFFORD et al., 1996; BIESALSKI; SHÄFFER, 1997; MONCZAK et al., 1997; ZHENG; SAVOLAINEN; KOISTINEN, 1997; HERGET et al., 1998).

Alguns estudos têm sugerido uma associação entre a presença e os níveis de expressão

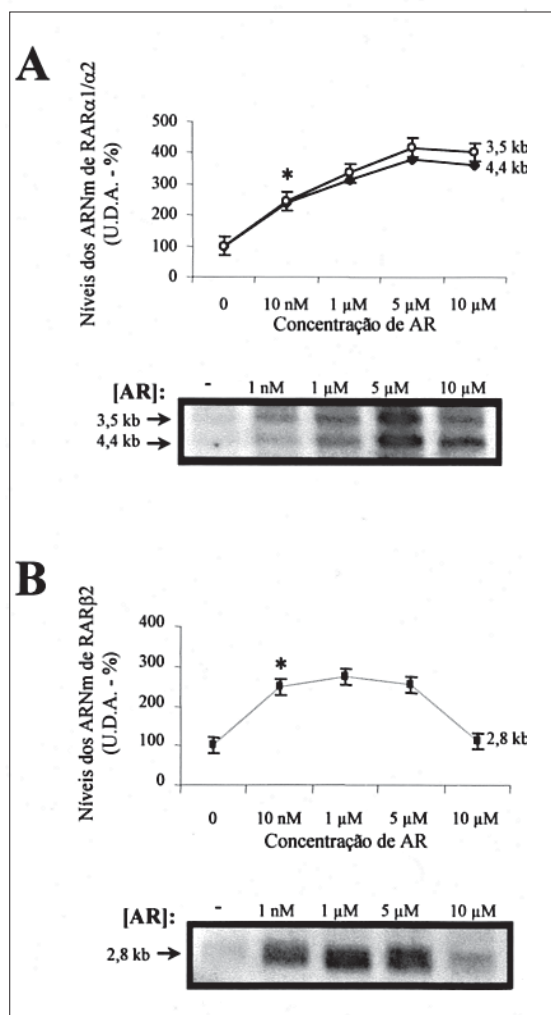


FIGURA 6 - Análise por Northern blot da expressão dos ARNm dos receptores RAR $\alpha$  (A) e RAR $\beta$  (B) nas células GL-15 e a regulação destes pelo AR. Os resultados são expressos em percentagem de Unidades Densitométrica

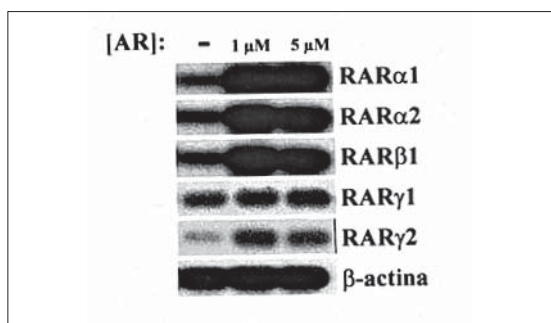


FIGURA 7 - Análise por RT-PCR da expressão dos ARNm dos receptores RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  e RAR $\gamma$  nas células GL-15 e a regulação destes pelo AR. As bandas correspondem s Arbitrárias em relação ao controle que é 100%. (n = 4 e \* p < 0,01). As bandas correspondem a uma experiência representativa entre quatro.

dos diferentes isotipos de receptores ao AR com a indução de um efeito antiproliferativo, apoptótico e/ou diferenciador em células tumorais de diferentes origens (NAGY et al., 1995; ORIDATE et al., 1996; CLIFFORD et al., 1996). Dessa forma, a indução dos RARs nos gliomas pode desempenhar um papel importante na terapia deste tipo de tumor. Este conceito é sustentado, por um lado, pela observação de que células de carcinoma do seio, entre outras células cancerosas, que perderam a expressão de RAR $\beta$  se tornaram insensíveis à ação do AR (WIDSCHWENDTER et al., 1997) e, por outro lado, pela observação de que a introdução de RAR $\beta$  em células insensíveis ao AR restaurou a sensibilidade ao AR (LIU et al., 1996). Observamos que as três isoformas de RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) eram expressas pelas células GL-15, e que as isoformas RAR $\alpha$ 1/2, RAR $\beta$ 2 e RAR $\gamma$ 2, eram sensíveis ao AR e poderiam, assim, participar nos efeitos observados.

Estudos obtidos em células embrionárias germinativas mostram que a expressão de certos fatores de crescimento endógenos implicados na apoptose são regulados pelos retinóides durante a diferenciação celular, um fato que sugere que a apoptose e a diferenciação celular seriam controladas por elementos reguladores separados e distintos (THOMPSON, 1995). Já foi bem demonstrado, em vários tipos de células cancerosas, que o nível de expressão de RAR $\alpha$  é relativamente constante, e que o tratamento com o ácido retinóico não altera ou altera muito pouco a expressão deste isotipo de receptor (CLIFFORD et al., 1990; MARTIN; BRADLEY; COTTER,

1990; HALL, 1992; CLAGETT-DAME et al., 1993). Igualmente, já foi mostrado, como nós mesmos o fizemos, que o tratamento das células de neuroblastoma com o AR induzia uma superexpressão do RAR $\alpha$  (WUARIN et al., 1994). As células de hepatoma, de carcinoma embrionário e de carcinoma escamoso, por outro lado, apresentam uma alta expressão de RAR $\beta$  após exposição ao AR, que está associada ao potencial diferenciador do AR (LI; WAN, 1998; FOLKERS; VAN DER BOURG; VAN DER SAAG, 1998; WAN; CAI; MAGEE, 1999). Graças ao fato de as células GL-15 responderem ao AR através de uma superexpressão dos dois tipos de receptores RAR $\alpha$  e RAR $\beta$ , uma relação entre estes dois tipos de receptores poderia ser um elemento fundamental para estimular e orientar as células gliomatosas para uma diferenciação eficaz ou para uma via apoptótica, e justifica a possibilidade de utilização de ligantes específicos aos diferentes isotipos de receptores como novos elementos terapêuticos para estes tumores.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Pierre Chambom, pela concessão de elementos fundamentais para a realização de parte deste trabalho, e ao Sr. J. L. Plassat, pela assistência técnica (Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, França). Silvia Lima Costa agradece especialmente o apoio financeiro da Universidade Federal da Bahia e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Abstract

*Malignant gliomas are highly invasive, rapidly proliferating tumors and present a poor prognosis. In this study, we investigated the potential effects of the retinoic acid (RA) on a high proliferative glioblastoma cell line, GL-15. The exposure to a single dose of t-RA reduces the cell growth, induces a transitory stage of the cell differentiation, and it finally leads to the apoptotic cell death depending on the RA concentration range and the time of exposure. We found that the GL-15 cells express constitutively the RARs isotypes  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , and that RAR $\alpha$ 1/2, RAR $\beta$ 2, and RAR $\gamma$ 2 expressions are induced by t-RA. These results suggest that the ratio of RAR isoforms may be a crucial element for inducing either efficient differentiation or apoptotic effects in those cells. Furthermore, they suggest that the use of ligands specific to each receptor isotype might be relevant for further glioma therapies.*

## Key words

Retinoic acid, glioma, apoptosis, differentiation, RAR

## Referências

- ATENCIA, R. et al. Apoptosis during retinoic acid-induced differentiation of embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*, n. 214, p. 663-667, 1994.
- BAUDET, C. et al. Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death program. *Cell Death Diff*, n. 5, p. 116-125, 1998.
- BIESALSKI, H. K.; SCHÄFFER, M. Comparative assessment of activity of beta-carotene, retinol-beta-D-glucuronide and retinoic acid on growth and differentiation of a human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Internat J Vit Nut Res*, n. 67, p. 357-363, 1997.
- BOCCHINI, V. et al. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiform. *Cell Tiss Res*, n. 265, p. 73-81, 1991.
- BOYLAN, J. F. et al. Targeted disruption of retinoic acid receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) and RAR $\gamma$  results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism. *Mol Cell Biol*, n. 15, p. 834-851, 1995.
- BURGER, P. C.; SCHEITHAUER, B. W. **Tumors of the central nervous system**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994.
- CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*, n. 10, p. 940-954, 1996.
- CHEN, Z. X. et al. A clinical and experimental study of all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*, n. 78, p. 1413-1419, 1991.
- CHIESA, R. et al. Extracellular calcium deprivation in astrocytes: regulation of mRNA expression and apoptosis. *J Neurochem*, n. 70, p. 1474-1483, 1998.
- CLAGETT-DAME, M. et al. Identification and characterization of all-trans-retinoic acid receptor transcripts and receptor protein in human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, n. 300, p. 684-693, 1993.
- CLIFFORD, J. L. et al. Modulation by retinoids of mRNA levels for nuclear retinoic acid receptors in murine melanoma cells. *Mol Endocrinol*, n. 4, p. 1546-1555, 1990.
- CLIFFORD, J. et al. RXR $\alpha$ -null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. *EMBO J*, n. 15, p. 4142-4155, 1996.
- DEANGELIS, L. M. et al. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy. *Ann Neurol*, n. 44, p. 691-695, 1998.
- DEFER, G. L. et al. All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *J Neur Oncol*, n. 34, p. 169-177, 1997.
- FOLKERS, G. E.; VAN DER BOURG, B.; VAN DER SAAG, P. T. Promoter architecture, cofactors, and orphan receptors contribute to cell-specific activation of the retinoic acid receptor beta promoter. *J Biol Chem*, n. 273, p. 32200-322012, 1998.
- GUDAS, L. J.; SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. In: SPORN, M. B.; ROBERTS, A. M.; GOODMAN, D. S. (Ed.) **The retinoids: biology, chemistry and medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press, 1994. p. 443-520.
- HALL, A. K. Retinoids and retinoic acid receptor differentially modulate thymosin b10 gene expression in transfected neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol*, n. 12, p. 45-58, 1992.
- HERGET, T. et al. Retinoic acid induces apoptosis-associated neural differentiation of a murine teratocarcinoma cell line. *J Neurochem*, n. 70, p. 47-58, 1998.
- HILDEBRAND, J. et al. Management of malignant brain tumors. *Eur Neurol*, n. 38, p. 238-253, 1997.
- KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P. Nonsteroid nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, n. 83, p. 859-869, 1995.
- KLEIHUS, P.; BURGER, P. C.; SCHEITHAUER, B. W. The new WHO classification of brain-tumors. *Brain Pathology*, n. 3, p. 255-268, 1993.
- LI, C.; WAN, YJY. Differentiation effects of retinoic acid receptor b in hepatome cells. *Cancer Letters*, n. 124, p. 205-211, 1998.
- LIU, Y. et al. Retinoic acid receptor b mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol*, n. 16, p. 1138-1149, 1996.
- LOTAN, R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J*, n. 10, p. 1031-1039, 1996.
- MANGELSDORF, D. J.; UMESONO, K.; EVANS, R. M. The retinoid receptors. In: SPORN, M. B.; ROBERTS, A. M.; GOODMAN, D. S. (Ed.) **The retinoids: biology, chemistry and medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press, 1994. p. 319-349.
- MARTIN, S. J.; BRADLEY, J. G.; COTTER, J. R. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophilic subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol*, n. 79, p. 2936-2940, 1990.
- MEHTA, K. et al. Activation of retinoid receptors RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL-60 cells. *Cell Growth Diff*, n. 7, p. 179-186, 1996.
- MONCZAK, Y. et al. Induction of apoptosis without differentiation by retinoic acid in PBL-985 cells requires the activation of both RAR and RXR. *Blood*, n. 90, p. 3345-3355, 1997.

- NAGY, L. et al. Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol*, n. 15, p. 3540-3551, 1995.
- ORIDATE, N. et al. Implications of retinoic acid receptor  $\gamma$  in squamous differentiation and response to retinoic acid head end neck SqCC/Y1 squamous carcinoma cells. *Oncogene*, n. 12, p. 2019-2028, 1996.
- SMITH, M. A. et al. Retinoids in cancer chemotherapy. *J Clin Onc*, n. 10, p. 839-864, 1992.
- TANEJA, R. et al. Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR $\gamma$  is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and camp treatment. *EMBO J*, n. 16, p. 6452-6465, 1997.
- THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, n. 267, p. 1456-1462, 1995.
- WAN, Y. J.; CAI, Y.; MAGEE, T. R. Retinoic acid differentially regulates retinoic acid receptor-mediated pathways in the Hep3B cell line. *Exp Cell Res*, n. 238, p. 241-247, 1999.
- WARRELL JR., R. P. Differentiating agents. In: DEVITA JR., V. T.; HELLMANN, S.; ROSENBERG, S. A. (Ed). *Cancer: principles and practice of oncology*. 5<sup>th</sup> ed. v. 1. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1997. p. 483-490.
- WIDSCHWENDTER, M. et al. Loss of retinoic acid receptor  $\beta$  expression in breast cancer morphologically normal adjacent tissue but not in normal breast tissue distant from cancer. *Cancer Res*, n. 57, p. 4158-4161, 1997.
- WUARIN, L. et al. Retinoic acid up-regulates nuclear retinoic acid receptor- $\alpha$  expression in human neuroblastoma cells. *Int J Cancer*, n. 56, p. 840-845, 1994.
- ZHENG, A.; SAVOLAINEN, E. R.; KOISTINEN, P. All-trans-retinoic acid induces apoptosis in acute myeloblastic leukemia cells. *Apoptosis*, n. 2, p. 319-329, 1997.