

**RELEVÂNCIA FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS
PRÍON CELULAR E STI1/HOP EM TUMORES DE
CÓLON, PÂNCREAS E MELANOMAS**

BRUNO COSTA DA SILVA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Bruno Costa da.

Relevância funcional das proteínas príon celular e STI1/HOP em tumores de cólon, pâncreas e melanomas / Bruno Costa da Silva – São Paulo, 2011.

104p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. MELANOMA. 2. NEOPLASIAS PANCREÁTICAS. 3. CÂNCER DE CÓLON. 4. PRÍONS. 5. METÁSTASE TUMORAL.

*A sabedoria não nos é dada.
É preciso descobri-la por nós mesmos,
depois de uma viagem que ninguém
nos pode poupar ou fazer por nós.*

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Vilma Martins, por ter oferecido a oportunidade inestimável de ingressar no seu grupo. Por ter acreditado na minha potencialidade, profissionalismo e honestidade. Por ter permitido com isso que eu retomasse a minha formação científica e a minha felicidade profissional. Por ser uma referência de qualidade, ética e profissionalismo. Por ter me oferecido magníficas oportunidades profissionais. Por, apesar de estar sempre envolvida em diversos compromissos e projetos, estar sempre à disposição para conversas tanto de caráter profissional quanto pessoal.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e educação. Por terem sempre alimentado a minha curiosidade e apoiado minhas escolhas, por mais caprichosas e ambiciosas que elas fossem. Por terem sempre acreditado nos meus sonhos. Não apenas quando se realizavam, mas especialmente quando pareciam distantes e improváveis. À minha irmã Sabrina e cunhado Rodrigo pelo carinho e por sempre vibrarem juntos em cada conquista.

Aos Doutores David Lyden e Hector Peinado, pelos valiosos ensinamentos técnicos e científicos. Pela oportunidade não apenas de aprender novas técnicas mas principalmente de participar ativamente de seus projetos.

Ao Dr. Rafael Malagoli, pelas orientações e ajuda nas marcações e análises de micro arranjo de tecidos.

Aos Doutores André Montagnini e Renata Coudry pela ajuda na montagem e análise dos micro arranjos de tecidos.

Aos pacientes que generosamente doaram as amostras de células e tecidos utilizados neste trabalho. Aos médicos, patologistas, pesquisadores e técnicos que permitiram que estas amostras fossem apropriadamente processadas, caracterizadas e organizadas.

Aos funcionários do departamento de anatomia patológica do Hospital AC Camargo Carlos, Ivan e Fátima pela ajuda nas marcações de imunohistoquímica e montagem de lâminas.

À Luciene Assif de Matos e Alessandro Landskron Diniz por gentilmente fornecerem os dados referentes aos casos de tumores de cólon e de pâncreas utilizados neste trabalho

À minha namorada, Maria Carolina, pelo carinho, doçura, amizade e companheirismo durante os altos e baixos do meu período de doutorado. Por suportar pacientemente todos os meus momentos de surtos de ansiedade e agitação. Por ter me introduzido em uma nova família, permitindo conviver com pessoas extraordinárias como seu pai, irmãos, avó, tias e primos. Pelos nossos momentos inesquecíveis em São Paulo e pelos que ainda estão por vir em Nova York.

Ao amigo Tiago “Tchê” dos Santos, pela amizade de quase 10 anos dê dos SBBqs em Caxambu da época de iniciação científica. Pelo apoio em todos os momentos da minha vinda à São Paulo, indicando o caminho das pedras, emprestando o sofá em diversas ocasiões e ajudando nos primeiros momentos de adaptação na nova vida de doutorado longe de casa. Pela parceria como *roomate*, nos botecos, discussões sobre questões existenciais, montagem e serragem de armários “pré-moldados”. Pela ajuda em diversos experimentos e burocracias de projetos, muitos destes realizados em momentos em que eu estava fora de São Paulo.

Para a minha amiga e colega de laboratório Ana Paula Sampaio, pela amizade e brincadeiras dentro e fora laboratório. Pela parceria em cafezinhos, botecos e conversas. Por ter dado uma ajuda inestimável ao me emprestar seu apartamento em São Paulo durante os 8 meses finais do meu doutorado.

Às amigas e mentoras Glauca e Marilene, pelos diversos ensinamentos durante o meu doutorado. Por serem referências de ética, qualidade e perseverança na produção científica. Pela amizade, pelos momentos divertidos e pelos ensinamentos extra-laboratório dignos de irmãs. Pelos seus respectivos Martin e Sylvio, que propiciaram momentos inesquecíveis regados a litros de chopp Brahma. Em especial ao Martin por ter ajudado a “conhecer” a minha namorada Maria Carolina.

À Nicolle, pela amizade, parceria na bancada e na mesa de computadores, conversas sobre experimentos e assuntos gerais. Pela companhia nas “estimadas” reuniões de quarta-feira e empreitadas nas padronizações e análises de experimentos.

Aos colegas e amigos de laboratório Michele, Flávio, Camila, Cleiton, Dominique e Lara pelos momentos fantásticos dentro e fora do laboratório. Pela ajuda em experimentos, pelas conversas no cafezinho, brincadeiras no laboratório, cervejas e *happy hours*.

Ao novo colega de laboratório Arthur, pela amizade, ajuda nos experimentos finais de imunocitoquímica, pelas conversas divertidas durante as incubações e fervuras intermináveis de lâminas.

Aos novos mestrandos e alunos de iniciação científica do laboratório Bruna, Giovanna, Pedro, Fernanda, Vivian, Rebeca e Juliana pela simpatia e companhia.

Aos grandes amigos feitos no Instituto Ludwig. Em especial aos amigos Enrique e Lara pela amizade, brincadeiras, *happy hours*, viagens e extravagâncias gastronômicas.

Aos bioteristas Caitlin Williams, Wanderlei e Oraci por permitirem a execução das experimentações animais dentro dos melhores padrões éticos.

À FAPESP pelo suporte financeiro que permitiu o desenvolvimento do projeto e o meu estágio de doutorado sanduíche nos Estados Unidos.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer por ter oferecido condições de trabalho e de aprendizado dignas dos melhores laboratórios de pesquisa do mundo.

Ao Hospital AC Camargo e ao CIPE, por nos acolher com tanta cordialidade e nos fornecer condições excepcionais de trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação e da biblioteca por sempre serem prestativos e atenciosos.

RESUMO

Costa-Silva B. **Relevância funcional das proteínas prion celular e STI1/HOP em tumores de cólon, pâncreas e melanomas.** São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado- Fundação Antônio Prudente].

Nos últimos anos, estudos vêm demonstrando a ampla distribuição e funcionalidade da proteína prion celular (PrP^C). No sistema nervoso, por exemplo, esta molécula está envolvida em processos celulares diversos tais como proliferação, sobrevivência e diferenciação. Análises detalhadas dos mecanismos envolvidos nestes processos, realizadas em nosso grupo, levaram à caracterização da co-chaperonina de camundongo STI1 (*stress inducible protein one*) e seu ortólogo humano HOP (HPS90/HSP70 Organizing Protein) como ligantes específicos de PrP^C. Trabalhos recentes do nosso grupo têm descrito o papel da interação PrP^C-HOP na proliferação de glioblastomas. Além disso, dados da literatura descrevem alterações na expressão de PrP^C e HOP em outros tipos tumorais, tais como em tumores de cólon (CC) pâncreas (CP). Desta forma, torna-se de grande relevância o estudo destas moléculas e seus eventuais papéis nestes tumores. Em nossos estudos pudemos determinar que PrP^C e HOP são expressas de maneira diferencial em linhagens de CC e CP. HOP é secretada por todas as linhagens celulares estudadas, sendo estes níveis de secreção diretamente relacionados a expressão total de HOP nestas células. Nas linhagens de CC o tratamento com STI1 recombinante foi capaz de promover a proliferação de linhagens com elevada expressão de PrP^C, o que não ocorreu em linhagens de CC com menor expressão desta proteína, sugerindo assim a importância da interação PrP^C-HOP neste processo. A partir do uso de inibidores da ligação de STI1/HOP e PrP^C pudemos sustentar a hipótese de que esta interação é importante para a promoção da proliferação da linhagem de CC estudada. Entretanto, a análise de 196 amostras de adenocarcinoma de cólon revelou que a expressão de PrP^C e

HOP parece não estar relacionada ao grau de proliferação dos CC, sugerindo que estas medidas possam não refletir os níveis de PrP^C na membrana e de HOP secretado nestes tumores. Por outro lado, a partir de experimentos *in vitro* e com amostras de pacientes de CP observamos que a expressão de HOP está relacionada ao grau de proliferação destes tumores, sendo que este processo parece ser independente de PrP^C. Iniciamos ainda o estudo do papel da interação destas duas proteínas no desenvolvimento de metástases em modelo de melanomas murinos. Das linhagens tumorais estudadas aquelas com alta capacidade metastática apresentam maior secreção de STI1 quando comparadas às de menor potencial metastático. A STI1 é secretada em vesículas e tem capacidade de aumentar a migração de macrófagos *in vitro* sugerindo que a secreção de STI1 pode estar envolvida com o recrutamento de células de medula óssea para o sítio pré-metastático. Experimentos *in vivo* demonstraram ainda que células PrP^C-positivas participam da formação do sítio pré-metastático. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho indicam que as proteínas PrP^C, STI1/HOP e do complexo formado entre elas podem ter um papel relevante no desenvolvimento de tumores e na formação de metástases e que isso pode ser específico para alguns tipos tumorais. A possibilidade do uso destas moléculas como alvos terapêuticos incentiva a continuação de estudos que avaliem sua contribuição na biologia tumoral.

SUMMARY

Costa-Silva Bruno. **[Functional relevance of cellular prion protein and STI1/HOP in colorectal and pancreatic tumors and melanomas]**. São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado- Fundação Antônio Prudente].

In the last years studies have shown the broad distribution and functionality of the Cellular Prion Protein (PrP^C). In the nervous system, for instance, this molecule is involved in cellular processes such as proliferation, survival and differentiation. Detailed analysis of mechanisms involved in these processes, performed in our group, allowed the characterization of the mouse co-chaperonin Stress inducible protein one (STI1) and its human orthologue Hsp70/Hsp90 Organizing protein (HOP) as specific ligands of PrP^C. Recent data from our group have shown the role of the PrP^C-HOP interaction in the proliferation of glioblastomas. The expression of PrP^C and HOP has been described to be altered in other tumor types, such as colorectal (CC) and pancreatic tumors (CP), which indicates a relevance of PrP^C-HOP, in the biology of these tumors. In our studies we determinate that PrP^C and HOP are differentially expressed in CC and CP cell lineages. In addition, HOP is secreted by all cell lineages at levels that are direct correlated to its expression. Recombinant STI1 promoted proliferation of CC cell lineages with high expression of PrP^C. The lack of proliferative effect of STI1 in CC lineages with low expression of PrP^C suggests that the PrP^C-HOP interaction is important to this process. Inhibitors of the PrP^C-HOP interaction sustained the hypothesis that this complex is important to the proliferative effect seen in CC cells with high PrP^C expression. However, immunohistochemistry analysis of 196 samples of human colorectal adenocarcinoma showed that the expression of PrP^C and HOP does not seem to be correlated to the proliferation index in these tumors. These results might suggest that this measurement may not reflect the levels of PrP^C in the cell membrane or the HOP secretion from these tumors. On the other hand, experiments using cell

lineages and patient samples from CP showed that the expression of HOP is correlated with the proliferation status of these tumors, however this process seems to be independent of PrP^C. Furthermore, we studied the role of PrP^C-STI1 complex in the development of metastasis in murine melanomas. Our data show that lineages with higher metastatic potential presented higher STI1/HOP secretion than those with lower metastatic potential. The secreted STI1 is found in vesicles and is able to increase macrophages migration *in vitro*, suggesting that STI1 secretion could be involved with the recruitment of bone marrow cells to the pre-metastatic niche. *In vivo* experiments also demonstrated that PrP^C-positive bone marrow derived cells participate of the pre-metastatic niche formation. Therefore, the results obtained here indicate that PrP^C, STI1/HOP and the complex between these molecules have a relevant role in tumor development and metastasis formation which may be tumor specific. The possibility to use these molecules as therapeutic targets motivates further studies that will increase the knowledge of the importance of these molecules in tumor biology.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1	Estrutura de PrP ^C	8
Figura 2	Esquema representativo da molécula de PrP ^C e seus principais domínios de interação a diferentes ligantes.....	10
Figura 3	Via de secreção convencional de proteínas com peptídeo sinal.....	16
Figura 4	Vias de secreção não convencionais de proteínas com peptídeo sinal.....	17
Figura 5	Vias de secreção não convencionais de proteínas solúveis.	19
Figura 6	Modelo da formação do sítio pré-metastático.....	23
Figura 7	Análise quantitativa da expressão de PrP ^C em linhagens de tumor de cólon.....	42
Figura 8	Análise quantitativa da expressão de PrP ^C em linhagens de tumor de pâncreas.....	43
Figura 9	Análise quantitativa da expressão de HOP em linhagens de tumor de cólon e pâncreas.....	44
Figura 10	Análise quantitativa da secreção de HOP em linhagens de tumores de cólon e pâncreas.....	46
Figura 11	Efeito de STI1 recombinante murino sobre a proliferação de linhagens tumorais de cólon e de pâncreas.....	48

Figura 12	Efeito de STI1, peptídeos competidores e anticorpos inibitórios da interação PrP ^C -HOP na proliferação da linhagem de adenocarcinoma colorretal humano WiDr.....	50
Figura 13	Efeito de STI1, peptídeos competidores e anticorpos inibitórios da interação PrP ^C -HOP na proliferação da linhagem de carcinoma pancreático humano MIA-PaCa-2.....	51
Figura 14	Análise da expressão de HOP, PrP ^C e Ki67 em TMAs de adenocarcinomas de Cólon.....	53
Figura 15	Análise da expressão de HOP, PrP ^C e Ki67 em TMAs de adenocarcinomas de Pâncreas.....	55
Figura 16	Dados de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma de Pâncreas em relação à expressão de HOP e PrP ^C	58
Figura 17	Análise quantitativa da expressão de STI1 e PrP ^C em linhagens de melanoma murino.....	60
Figura 18	Análise do perfil de secreção de proteínas em linhagens de melanomas, de cólon e de pâncreas.....	62
Figura 19	Efeito de STI1 e anticorpo anti-STI1 ₂₃₀₋₂₄₅ na proliferação das linhagens de melanoma murino B16F1 e B16F10.....	63
Figura 20	Análise quantitativa da presença de STI1 em vesículas e fração solúvel de meios condicionados de B16F1 e B16F10.....	63
Figura 21	Análise de unidades formadoras de colônias em medula óssea e sangue periférico de animais inoculados com vesículas de B16F10.....	65

Figura 22	Análise da expressão de PrP ^C em células da medula óssea e em pulmão pré-metastático.....	66
Figura 23	Análise de populações PrP ^{C+} na medula óssea, sangue periférico e pulmões normais, pré e pós metastáticos.....	68
Figura 24	Medida dos efeitos da interação STI1/PrP ^C na ligação e efeitos pró-migratórios de vesículas de B16F10 sobre macrófagos RAW 264.7.....	70
Figura 25	Proposta do papel de STI1/HOP secretado por tumores sobre o recrutamento de progenitores hematopoiéticos para sítios pré-metastáticos.....	84
Quadro 1	Dados demográficos dos pacientes e anatomopatológicos dos tumores de cólon usados na confecção do micro arranjo de tecidos quanto a expressão de HOP e PrP ^C	54
Quadro 2	Dados demográficos dos pacientes e anatomopatológicos dos tumores de pâncreas usados na confecção do micro arranjo de tecidos quanto a expressão de HOP e PrP ^C	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNO₃	Nitrato de Prata
Anti-pep-STI1	Anticorpos anti-peptídeo 230-245 de STI1
Aplp1	Proteína semelhante ao precursor beta amilóide tipo 1
AJCC	Comitê da junta americana sobre o câncer
ATCC	Coleção americana de tipos de cultura
BrdU	Bromodeoxiuridina
CA 19-9	Antígeno cancerígeno 19-9
CC	Câncer de cólon
CFU-E	Unidades formadoras de colônia de eritrócitos
CFU-G	Unidades formadoras de colônia de granulócitos
CFU-GM	Unidades formadoras de colônia de granulócitos e macrófagos
CFU-M	Unidades formadoras de colônia de macrófagos
COPI	Complexo de revestimento e carregamento de proteínas tipo I
COPII	Complexo de revestimento e carregamento de proteínas tipo II
CP	Câncer Pancreático
CRMP-2	Proteína mediadora da resposta a colapsina tipo 2
CTM	Células tronco mesenquimais
Cu²⁺	Íon Cobre
DAPI	4',6' diamino-2-fenilindol
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado com Ham F12
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilonodiamino tetraacético
ELISA	Imunoensaio enzimático com imunorreagente marcado ligado a enzima
ERK	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos tipo 2

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDF15	Fator de crescimento e diferenciação tipo 15
GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
GPS	Peptídeo sinal para GPI
HC	Domínio hidrofóbico
HCl	Ácido Clorídrico
HOP	Proteína organizadora de proteínas Hsp70 e Hsp90
HOP₂₃₀₋₂₄₅	Peptídeo de equivalente aos aminoácidos das posições 230 a 245 da proteína HOP
HOP₆₁₋₇₆	Peptídeo de equivalente aos aminoácidos das posições 61 à 76 da proteína HOP
HPsGs	Proteoglicanos de heparan sulfato
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hsp90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
IgG	Imunoglobulina tipo G
IL-1β	Interleucina 1 β
kD	Constante de dissociação
kDa	<i>Kilo Daltons</i>
LOX	Lisil oxidase
MMP9	Metaloproteinase 9
MP	Micropartículas
MT	Metástases tumorais
MV	Microvesículas
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
N-CAM	Molécula de Adesão celular de neurônios
NH₄OH	Hidróxido de Amônia
OCT	Temperatura ótima para corte
OR	Porção flexível N-terminal com a sequência de octapeptídeo
PBS	Salina tamponada de fosfato

PBS-A	PBS contendo 1% de albumina sérica bovina
PBS-E	Salina tamponada de fosfato contendo Ácido Etilonodiamino tetraacético e Albumina sérica bovina
PBS-T	Salina tamponada de fosfato contendo triton-X-100
PCE	Progenitores endoteliais
PCH	Progenitores hematopoiéticos derivados da medula óssea
Pep HOP₂₃₀₋₂₄₅	Peptídeo 230-245 de HOP
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Cinase
PKA	Proteína Cinase A
PIGF	Fator de crescimento placentário
PrP^C	Proteína príon celular
PrP^{Sc}	Príons
PtdIns(4,5)P2	Fosfatidilinositol-4,5-difosfato
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
sAA3	Soro amiloide A3
SDS	Duodecilsulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNARE	Receptores de proteínas acessórias da proteína de fusão solúvel sensível a N-etilmaleimida
STI1	do inglês <i>Stress inducible protein 1</i>
TBST	Solução contendo Tris, NaCl e Tween 20
TFF3	Fator trevo tipo 3
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
TMA_s	Micro arranjos de tecidos
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TSE_s	Encefalopatias espongiformes transmissíveis
VEGFA	Fator de crescimento de endotélio vascular A

LISTA DE MATERIAIS

Material	Fabricante
Ácido Bórico	Merck
Ácido Cítrico	EMD
Advance HRP Enzyme	Dako
Advance HRP Link	Dako
AgNO ₃	EMD
Albumina sérica bovina	Sigma
Anticorpo anti-Actina	Sigma
Anticorpo anti-BrdU conjugado a biotina	Chemicon
Anticorpo anti-CD11b	Stem Cell Technologies
Anticorpo anti-F4/80	Ebioscience
Anticorpo anti-Gr1	Biolegend
Anticorpo anti-pep-STI1	Bethyl
Anticorpo anti-PrP ^C 3F4	Covance
Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à Cy-3	Amersham
Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Ficoeritrina	Dako
Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado FITC	Dako
Anticorpos secundários conjugados com peroxidase	Amersham
Anti-Ki67 clone MIB1	DAKO
Aparelho Scanscope	Aperio
Azul de bromofenol	Merck
B-mercaptoetanol	Merck
BrdU	Sigma
Colagenase D	Roche
DAPI	Sigma

Dispase	Invitrogen
DMEM	Gibco-BRL
DMEM-F12	Gibco-BRL
DNase I	Roche
EDTA	Merck
Eosina	Merck
FACSCalibur	BD Biosciences
Filtro concentrador Minicon	Millipore
Formaldeído	Merck
Glicerol	Merck
Glicina	Merck
HCl	Merck
Hematoxilina	Merck
Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Isoflurano	Baxter Healthcare corp.
Kit ECL Western blotting analysis system	Amersham
Membranas de Nitrocelulose	Amersham
Metanol	Merck
Methocult	Stem Cell Technologies
Molico	Nestlè
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaOH	Merck
NH ₄ OH	Merck
Orto Fenil Diamino	Sigma
Peróxido de Hidrogênio	Merck
PFA	Sigma
PKH2 linker	Sigma
Ponceau	Sigma
ProLong® gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen
Sacarose	Merck
SDS	Merck

Sistema LSAB+ HRP	DAKO
Sistema Trans-Blot Semi-Dry	Bio-Rad
Sistema Trans-Blot Semi-Dry	Bio-Rad
Software Graphpad Prism	Graphpad Software, Inc
Software ImageScope	Aperio
Software Scion Image	Scion Corporation
Soro de Cavalo	Gibco-BRL
Streptavidina conjugada ao fluorocromo Alexa 488	Molecular Probes
Substrate-Chromogen (DAB)	Dako
Tampão de lise ACK	Invitrogen
Tissue-Tek film	Sakura Finetek
Tissute-Tek OCT	Sakura Finetek
Transwell	Costar
TRIS	Invitrogen
Triton	Sigma
Tween 20	Sigma
Xilol	Roche

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumores colorretais, pancreáticos e melanomas	1
1.1.1	Tumores colorretais	1
1.1.2	Tumores pancreáticos	3
1.1.3	Tumores de pele e Melanomas	4
1.2	A Proteína príon celular (PrP ^C)	6
1.3	<i>Stress inducible protein 1/ Hsp70/Hsp90 organizing protein</i> (STI1/HOP)	11
1.4	Efeitos biológicos da interação PrPC-STI1/HOP	12
1.5	PrP ^C e STI1/HOP em tumores	13
1.6	Secreção de proteínas	14
1.7	Secreção de proteínas no câncer	19
1.8	Metástases e sítio pré-metastático	22
2	OBJETIVO	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Linhagens celulares e seu cultivo	27
3.2	Ensaio de migração celular	27
3.3	Ensaio <i>in vivo</i>	28
3.4	Análise das unidades formadoras de colônia de progenitores hematopoiéticos	30
3.5	Imunofluorescência	30
3.6	Citometria de fluxo	31
3.7	Isolamento de vesículas do meio condicionado	32
3.8	Ensaio de ligação de vesículas a células	32
3.9	SDA-PAGE e ensaios de “Immunoblotting”	33

3.10	Marcação de proteínas em gel de prata	34
3.11	Imunoensaio enzimático com imunorreagente marcado ligado a enzima (ELISA)	35
3.12	Ensaio de proliferação	36
3.13	Micro arranjo de tecidos e imunohistoquímica.....	37
3.14	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Análise da expressão de PrP ^C e HOP em linhagens de tumores colorretais e pancreáticos.....	41
4.2	Análise da secreção de HOP em linhagens de tumores colorretais e pancreáticos	45
4.3	Avaliação do efeito de STI1 na proliferação de linhagens de linhagens tumorais de cólon e pâncreas.....	46
4.4	Avaliação <i>in vitro</i> do papel da interação STI1/HOP-PrP ^C na proliferação das linhagens humanas de tumores colorretal WiDr e pancreático MIA PaCa-2.....	47
4.5	Avaliação da expressão de PrP ^C e HOP em tecidos de tumores colorretais e pancreáticos e sua correlação com a proliferação	52
4.6	Avaliação do papel de STI1/HOP derivado de tumores e PrP ^C no processo de metástase tumoral.....	59
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ANEXOS

- Anexo 1** Artigo publicado na revista *Stem Cells*
Anexo 2 Artigo submetido para a revista *Nature Medicine*
Anexo 3 Artigo a ser submetido para a revista *Nature Medicine*

- Anexo 4** Artigo a ser submetido para a revista *Journal of Cell Biology*
- Anexo 5** Artigo a ser submetido para a revista *Cancer Research*
- Anexo 6** Dados de expressão de PrP^C, STI1 e marcadores de leucócitos em tecidos de camundongos com tumor B16F10

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUMORES COLORRETAIS, PANCREÁTICOS E MELANOMAS

1.1.1 Tumores Colorretais

O câncer colorretal (CC) é mundialmente o quarto tipo de câncer mais comum, apresentando maior incidência em países desenvolvidos do que naqueles em desenvolvimento (PARKIN et al. 2005). Estima-se que em 2008 1,2 milhões de novos casos tenham surgido mundialmente, sendo que no mesmo período 608.700 pacientes morreram em decorrência desta doença. As maiores incidências observadas foram na Nova Zelândia, Europa e América do Norte e as menores na África e Ásia, sendo que homens são mais susceptíveis que mulheres (JEMAL et al. 2011). Grupos de elevado risco incluem pessoas com histórico pessoal de CC ou adenoma, pacientes com inflamação intestinal crônica (tais como retocolite ulcerativa crônica e Doença de Cronh) (Ministério da Saúde 2009) e pessoas com histórico familiar de CC (tais como polipose adenomatosa familiar, CC não poliposo hereditário e Polipose Juvenil e de Peutz-Jegher) (LYNCH 2007).

A incidência de CC tem crescido rapidamente em áreas onde a ocorrência dessa doença é historicamente baixa, tais como Espanha e países do leste da Ásia e Europa, Américas Central e do Sul. Tais mudanças devem-se provavelmente a mudanças de padrões de dieta,

sedentarismo, obesidade, etilismo e tabagismo (CENTER et al. 2009). Os Estados Unidos foram o único país aonde a incidência deste tumor reduziu significativamente nos últimos anos, evento este resultante principalmente da detecção e remoção de lesões pré-malignas em decorrência de um melhor monitoramento desta doença (CENTER et al. 2009; EDWARDS et al. 2010).

Ainda a respeito da epidemiologia, tendo em vista a clara relação entre faixa etária e incidência (92% dos casos são diagnosticados em indivíduos com mais de 50 anos) (JEMAL et al. 2008), o atual envelhecimento da população tem também elevado significativamente o número de indivíduos com risco de desenvolver CC (BENSON 2007). Em áreas aonde esteja ocorrendo aumento da média de idade da população e dos fatores de risco supracitados, como por exemplo no Brasil, aonde em 2010 ocorreram 13.310 novos casos de CC entre homens e 14.800 entre mulheres, o que corresponde a 14 casos novos a cada 100 mil homens e 15 a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2009), a aplicação de medidas preventivas torna-se especialmente necessária (LAMBERT et al. 2009).

A agressividade deste tumor e a sobrevida estimada dos pacientes portadores de CC são determinadas principalmente pelo método de estadiamento baseado no sistema TNM (GUNDERSON et al. 2010) que leva em conta características relativas ao tumor primário (T), metástases em linfonodos regionais (N) e metástases distantes (M) (CUNNINGHAM et al. 2010), que segue as recomendações originais descritas por (DENOIX 1954) e preconizadas pela União internacional de controle do câncer (UICC) e pelo

Comitê da Junta Americana sobre o câncer (AJCC) (ANDERSON 1974).

Apesar da sobrevida neste tipo de neoplasia ser considerada boa (média global de 5 anos em torno de 55% em países desenvolvidos e de 40% em países em desenvolvimento) e dos recentes avanços cirúrgicos e farmacológicos, o tratamento de pacientes com CC, que atualmente somam 2,4 milhões pessoas mundialmente (Ministério da Saúde 2009), especialmente os em quadros avançados, ainda representam um desafio às abordagens atuais (MOERTEL et al. 1990; KROOK et al. 1991; BOMAN e HUANG 2008; GUNDERSON et al. 2010).

1.1.2 Tumores Pancreáticos

Os cânceres pancreáticos (CP) encontram-se entre os mais letais, sendo o décimo tipo de câncer mais comum entre os americanos (FAZAL e SAIF 2007), onde se estima que em 2010, 43.140 pessoas tenham recebido diagnóstico para este câncer, sendo que 36.800 destas virão ou já vieram a morrer em decorrência desta doença (American Cancer Society-ACS 2011b). No Brasil, o câncer de pâncreas representa 2% de todos os tipos de câncer, sendo responsável por 4% do total de mortes decorrentes de cânceres. Sabe-se ainda que a incidência da doença aumenta com o avanço da idade: de 10/100.000 em indivíduos entre 40 e 50 anos para 116/100.000 em indivíduos entre 80 e 85 anos, sendo de rara incidência antes dos 30 anos de idade (Ministério da Saúde 2009). Como fatores de risco destacam-se histórico familiar desta doença (PERMUTH-WEY e EGAN 2009), pancreatite crônica (HART et al. 2008), histórico de diabetes (HUXLEY et al.

2005), obesidade (LI D et al. 2009) e etilismo (JOHANSEN et al. 2009). Entretanto o fator de risco mais consistente para CP é o tabagismo (GANDINI et al. 2008; HART e KENNEDY; HARVEY 2008), que aumenta em 75% o risco de desenvolver este câncer, sendo que o tempo de consumo e o número de cigarros consumidos são diretamente proporcionais ao aumento deste risco (IODICE et al. 2008).

Para o estadiamento de CP avalia-se o tamanho do tumor primário e comprometimento de estruturas adjacentes (T, *in situ* a T4), presença ou ausência de metástases linfonodais (N) ou a distância (M) (KATZ et al. 2008). A combinação destes três parâmetros permite separar casos em diferentes estádios clínicos e assim predizer a sobrevida esperada de pacientes com tumores ressecáveis, localmente avançados ou com metástases distantes. Apesar dos avanços recentes relacionados à patologia, bases moleculares e tratamento, o índice de sobrevivência por 5 anos após o diagnóstico não passa dos 4% em qualquer estágio da doença (FAZAL e SAIF 2007).

1.1.3 Tumores de Pele e Melanomas

Cânceres de pele são os tipos de câncer mais comuns. Apesar dos melanomas compreenderem apenas 5% destes casos, eles são a principal causa de morte por câncer de pele (ACS 2011a). Estima-se que 132.000 novos casos de melanomas sejam diagnosticados mundialmente todos os anos, sendo que o número de mortes anual em decorrência desta doença é de 65.161 (World Health Organization-WHO 2011). No Brasil estima-se a

ocorrência de 5.930 casos de melanoma no ano de 2010 (Ministério da Saúde 2009). Sabe-se ainda que a incidência em caucasianos é pelo menos 16 vezes maior que em afrodescendentes e 10 vezes maior que em hispânicos. Entretanto, apesar da menor incidência em indivíduos de pele mais escura, a morbidade nestes grupos é maior, em especial pelo seu diagnóstico comumente tardio (GLOSTER e NEAL 2006). Como a incidência de cânceres de pele cresce em um ritmo alarmante, a sua ameaça à saúde pública pode ser considerada de extrema relevância (NARAYANAN et al. 2010).

Apesar da patogênese de tumores de pele ser multifatorial, a exposição à radiação ultravioleta é o principal fator contribuinte (DIEPGEN e MAHLER 2002). Outro fator de risco refere-se à história pessoal de melanoma, sendo que de 1 a 8% dos pacientes com histórico desta doença desenvolverão melanomas primários múltiplos (STAM-POSTHUMA et al. 2001). Indivíduos com história familiar dessa doença que já apresentaram focos primários deste tumor têm uma chance 19% maior de desenvolver focos secundários (FERRONE et al. 2005). Quando detectados em seus estágios iniciais, casos de melanoma apresentam uma sobrevida de 98% em um período de 5 anos. Já quando estes tumores alcançam linfonodos a sobrevida cai para 62%, e quando se disseminam para outros órgãos além de linfonodos (como pulmões e fígado) este índice cai para apenas 15% (ACS 2011a).

Melanomas malignos são frequentemente agressivos, pouco previsíveis e de difícil tratamento. Mortes por metástases em casos de

melanomas têm sido registradas mesmo 35 anos após a remoção do tumor primário (SINGH et al. 2004). A mortalidade nestes casos continua alta especialmente pela resistência destas metástases às principais terapias atuais (ZBYTEK et al. 2008; YANG e CHAPMAN 2009), que são na sua maioria paliativas e resultam em respostas em menos de 20% dos casos, não apresentando benefícios significativos à sobrevida dos pacientes (BHATIA et al. 2009).

1.2 A PROTEÍNA PRÍON CELULAR (PrP^C)

Os príons (PrP^{Sc}) foram originalmente identificados em encéfalos de ovelhas contaminadas com *scrapie*, doença relacionada ao grupo de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) (PRUSINER 1998). A análise do tecido permitiu a identificação deste agente infeccioso proteico e, a partir de seu sequenciamento de seus aminoácidos, foi possível a identificação do gene *Prnp* que codifica a isoforma normal de PrP^{Sc} denominada príon celular (PrP^C). Esta é uma glicoproteína de aproximadamente 250 aminoácidos de 27 kDa que encontra-se ligada à membrana plasmática através de uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), preferencialmente localizada em domínios de membrana ricos em colesterol denominados “rafts” (PRUSINER 1991; MADORE et al. 1999; LINDEN et al. 2008).

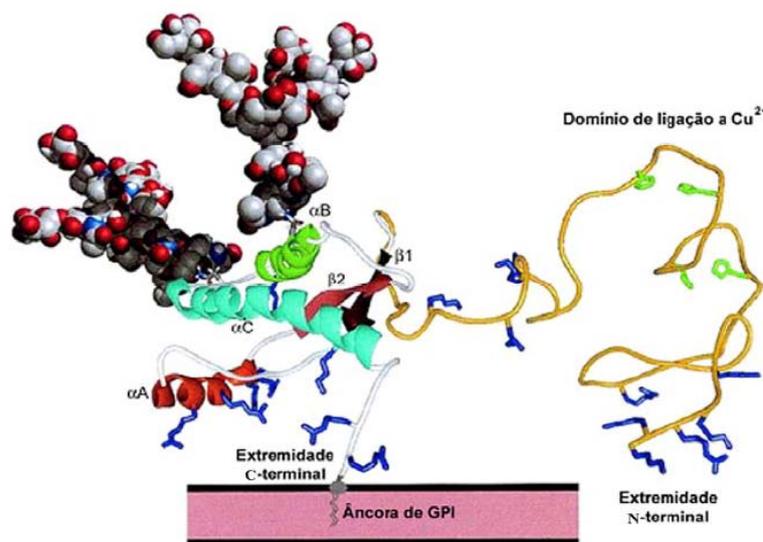
PrP^C é sintetizada no retículo endoplasmático (RE) rugoso, encaminhada para o Golgi e transportada até a superfície celular (HARRIS

1999). No RE rugoso o peptídeo sinal N-terminal (resíduos 1-22) e o segmento hidrofóbico C-terminal (resíduos 231-253) são clivados, seguindo-se a adição da âncora de GPI (STAHL et al. 1987). Além disso, duas cadeias de oligossacarídeos são adicionadas nos resíduos asparagina 181 e 197 e uma ponte de dissulfeto é formada entre os resíduos de cisteína 179 e 214 (CAUGHEY et al. 1989; RUDD et al. 2002). A molécula de PrP^C madura contém 207 resíduos, pode apresentar-se mono, di ou não glicosilada e ligada à face externa da membrana plasmática por uma âncora de GPI (CAUGHEY et al. 1989; BENNION e DAGGETT 2002) (Figura 1).

Além da já bem descrita expressão de PrP^C no sistema nervoso (FORD et al. 2002a; SALES et al. 2002), estudos vêm demonstrando a expressão de PrP^C em tecidos não neuronais, tais como sistema linfóide, coração, rim, músculos, glândulas parótidas e adrenais, pulmão, útero, fígado, epitélio gastrointestinal, pâncreas e melanócitos (MANSON et al. 1992; HORIUCHI et al. 1995; FOURNIER et al. 1998; KUBOSAKI et al. 2001; FORD et al. 2002b; AMSELGRUBER et al. 2006; LINDEN et al. 2008; LI e XIN 2010).

Apesar de experimentos iniciais envolvendo animais deficientes em PrP^C não demonstrarem um papel claro para esta proteína (BUELER et al. 1992), posteriormente diversas funções relevantes já foram sugeridas, tais como influência na eletrofisiologia e função hipocampal (MANSON et al. 1992; COLLINGE et al. 1994; COLLING et al. 1996; COLLING et al. 1997), participação na regulação do ritmo circadiano (TOBLER et al. 1996), modulação do sistema glutamatérgico (COITINHO et al. 2002), sensibilidade

à convulsões (WALZ et al. 1999), controle da atividade locomotora (ROESLER et al. 1999), regulação da ansiedade (NICO et al. 2005) e formação de memória (COITINHO et al. 2003). Estudos realizados em nosso grupo, por exemplo, demonstraram que a interação



Legenda: Linha amarela representa a porção N-terminal (resíduos 23-124), e a âncora de GPI em cinza. Estrutura secundária: hélice A (α A; resíduos 144-156; vermelho), hélice B (α B; resíduos 177-193; verde), hélice C (α C; resíduos 200-223; azul claro), folhas- β β 1 (resíduos 128-131; vermelho) e β 2 (resíduos 160-164; vermelho escuro). Cadeias envolvidas com a ligação de cobre são mostradas em verde, resíduos de lisina e arginina são representados em azul.

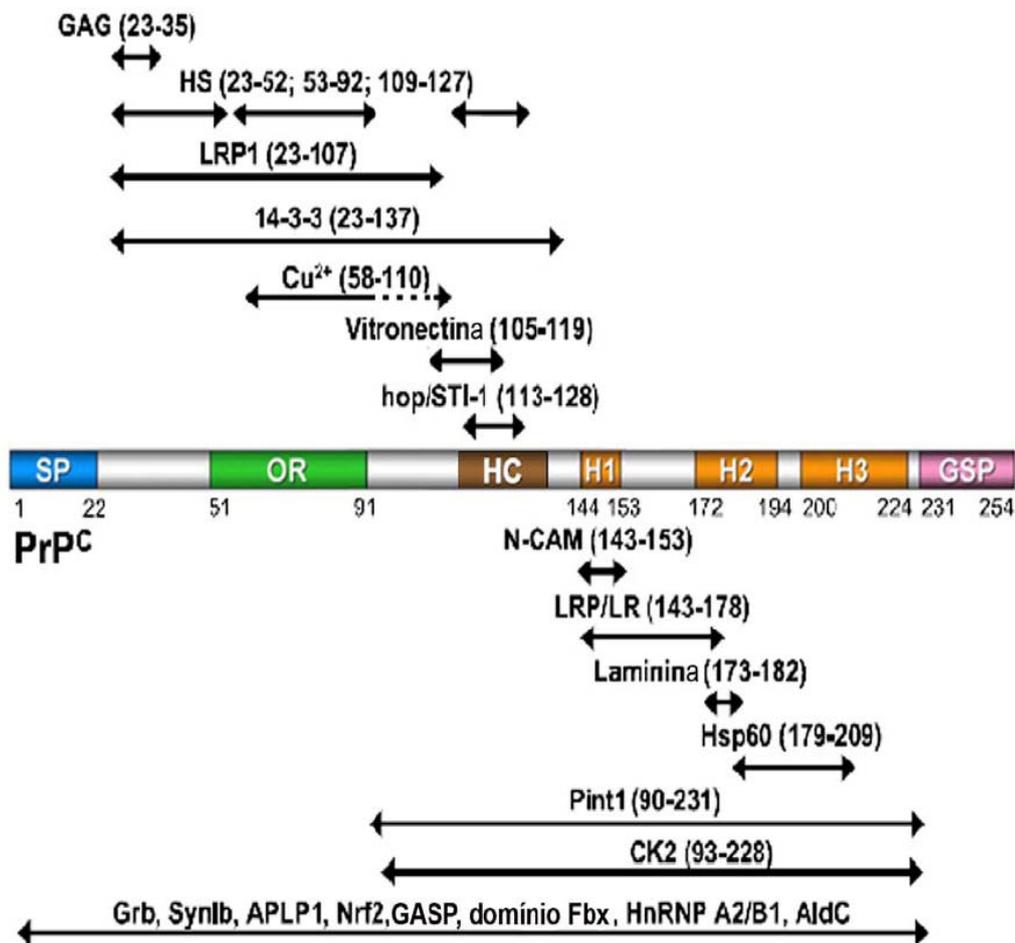
Fonte: Adaptado de BENNION e DAGGETT (2002).

Figura 1 - Estrutura de PrP^C.

específica de PrP^C com as proteínas de matriz extracelular laminina e vitronectina está envolvida no processo de neuritogênese e plasticidade neuronal (GRANER et al. 2000a; GRANER et al. 2000b; HAJJ et al. 2007).

Durante os últimos anos vários ligantes de PrP^C foram identificados. Eles podem interagir com diferentes regiões desta molécula (Figura 2) e para alguns deles foi identificada uma função específica decorrente desta

associação. PrP^C interage com plasminogênio (ELLIS et al. 2002) e caseína cinase (MEGGIO et al. 2000), modulando suas atividades. Já quando associada ao íon Cu²⁺, PrP^C apresenta atividade enzimática similar a superóxido dismutase-1 (BROWN e BESINGER 1998). Além destas, diversas moléculas foram identificadas como sendo ligantes ou receptores de PrP^C. Dentre elas, pode-se mencionar Aplp1, Nrf2 (YEHIELY et al. 1997), glicosaminoglicanas (GONZALEZ-IGLESIAS et al. 2002; HORONCHIK et al. 2005), N-CAM (SCHMITT-ULMS et al. 2001; SANTUCCIONE et al. 2005) e outras (LEE et al. 2003; LINDEN et al. 2008) (Figura. 2).



Legenda: Desenho esquemático de PrP^C mostrando o peptídeo sinal N-terminal (SP) o peptídeo sinal para GPI (GSP), a porção flexível N-terminal com a sequência de octapeptídeo (OR) e o domínio hidrofóbico (HC). Os retângulos cor de laranja (H1, H2 e H3) representam regiões de estrutura α -hélice. A figura destaca os domínios de interação de PrP^C a diferentes ligantes.

Fonte: Adaptado de LINDEN et al. (2008).

Figura 2 - Esquema representativo da molécula de PrP^C e seus principais domínios de interação a diferentes ligantes.

1.3 STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1 e seu ortólogo humano Hsp70/Hsp90 ORGANIZING PROTEIN

Outro ligante de PrP^C também caracterizado pelo nosso grupo é a co-chaperonina STI1 (do inglês *Stress Inducible Protein 1*), originalmente descrita como uma proteína capaz de se associar e modular a atividade de proteínas Hsp70 e Hsp90 (SONG e MASISON 2005). Seu ortólogo humano é denominado de HOP (do inglês *Hsp70/Hsp90 Organizing protein*), cujo transcrito contém 2079 pares de bases que codificam para uma sequência de 543 aminoácidos, resultando em um peso molecular aparente de 66kDa (SCHEUFLER et al. 2000).

A distribuição intracelular de STI1 é predominantemente citoplasmática. Entretanto, sua presença no núcleo já foi descrita, o que aponta para a existência de um processo de importação nuclear de STI1 (LASSLE et al. 1997; LONGSHAW et al. 2000). Além de sua presença na membrana plasmática (MARTINS et al. 1997; ZANATA et al. 2002; ODUNUGA et al. 2004), experimentos envolvendo linhagens tumorais e culturas primárias de astrócitos mostraram que STI1 (LIMA et al. 2007) e HOP (EUSTACE e JAY 2004) podem ser secretadas, podendo assim ser também encontradas extracelularmente. A STI1 secretada desempenha um papel trófico tanto em neurônios como em células da glia (LIMA et al. 2007).

Recentemente, demonstramos que STI1 pode ser secretada por astrócitos tanto na forma solúvel quanto em vesículas de 3 tamanhos e composições distintas, sendo este mecanismo dependente de PrP^C (vide

Anexo 4).

1.4 EFEITOS BIOLÓGICOS DA INTERAÇÃO PrP^C-STI1/HOP

A ligação específica e saturável entre PrP^C e STI1 (*Kd* de 10⁻⁷M), previamente caracterizada pelo nosso grupo, ocorre entre os resíduos 113-128 (GAAAAGAVVGGLGGYM) de PrP^C (Figura 2) e nos aminoácidos 230-245 (ELGNDAYKKKDFDKAL) de STI1 (ZANATA et al. 2002) que são equivalentes na molécula de HOP.

Efeitos biológicos importantes já foram atribuídos à associação entre PrP^C e STI1, tais como a ativação de sinais de neuroproteção dependentes da atividade de PKA em neurônios hipocampais e retinianos (CHIARINI et al. 2002; LOPES et al. 2005), sinais que levam ao crescimento neurítico através da ativação de Erk1/2 (LOPES et al. 2005) e indução de sinais citoprotetores através da atividade de superóxido dismutase em linhagens neuronais transfectadas com PrP^C (SAKUDO et al. 2005). Também já foram descritas funções de STI1 que ocorrem de maneira independente de PrP^C, principalmente ligadas à modulação da proliferação celular, como observado em distintas camadas da retina em desenvolvimento (ARRUDA-CARVALHO et al. 2007) e também em cultura primária de astrócitos (ARANTES et al. 2009). Vimos ainda recentemente que STI1 pode se ligar a PrP^C em neuroesferas, promovendo a proliferação de progenitores e células tronco neurais (SANTOS et al. 2011; Anexo 1).

1.5 PrP^C E STI1/HOP EM TUMORES

Estudos vêm sugerindo um papel relevante de PrP^C na biologia de células tumorais. Como exemplo, pode-se mencionar o aumento da expressão de PrP^C em cânceres de estômago, apresentando efeitos positivos na proliferação (LIANG et al. 2007), inibitórios sobre a apoptose (LIANG et al. 2006) e promotores de invasão e de metástase (PAN et al. 2006).

Nosso grupo demonstrou a participação de HOP na proliferação de linhagens derivadas de glioblastoma humano. HOP pode ser secretada pelas células tumorais e de maneira autócrina aumentar a proliferação celular, sendo esse efeito modulado pela ativação das vias de Erk e PI3K e dependente da interação com PrP^C (ERLICH et al. 2007). Nossos resultados demonstram ainda que um peptídeo de HOP (pep HOP₂₃₀₋₂₄₅), correspondente ao domínio de ligação à PrP^C, é capaz de competir pela interação entre HOP e PrP^C na membrana plasmática, reduzindo o efeito de HOP sobre a proliferação celular em linhagens de glioblastomas humanos (vide anexo 3). Estes resultados demonstram que este peptídeo pode representar uma possível ferramenta molecular para futuras abordagens terapêuticas visando o tratamento deste tipo tumoral.

Dados da literatura têm descrito um aumento na expressão de PrP^C (ANTONACOPOULOU et al. 2008; MCEWAN et al. 2009) e seu ligante HOP (MURRAY et al. 2006; KUBOTA et al. 2010) em CC. Foi demonstrado ainda que anticorpos anti-PrP^C são capazes não apenas de retardar o processo de

proliferação celular, mas também de induzir apoptose em linhagens humanas de tumores de cólon (MCEWAN et al. 2009). Além disso, foi relatada a expressão de PrP^C e HOP em CP humanos, onde sugeriu-se a participação destas moléculas em processos de proliferação celular, invasão e crescimento tumoral (LI C et al. 2009; WALSH et al. 2009; SY et al. 2010). Demonstrou-se ainda que a expressão de PrP^C em melanomas pode apresentar relação com a capacidade de invasão deste tumor (LI C et al. 2010).

Nos últimos anos tem sido demonstrada a expressão de HOP em linhagens de CC e CP (WALSH et al. 2009; KUBOTA et al. 2010). Já em modelo de câncer de ovário, demonstrou-se que HOP pode ser secretada por tumores para o sangue periférico, apresentando papel como marcador de malignidade nestes tumores (WANG et al. 2010). Sabe-se ainda que HOP, juntamente com Hsp27, Hsp60 e HspA8, é expressa em melanomas primários e metastáticos (CARTA et al. 2005). Entretanto, estudos que enfoquem no papel da interação entre PrP^C e HOP secretada em CC, CP e melanomas ainda são inéditos.

1.6 SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

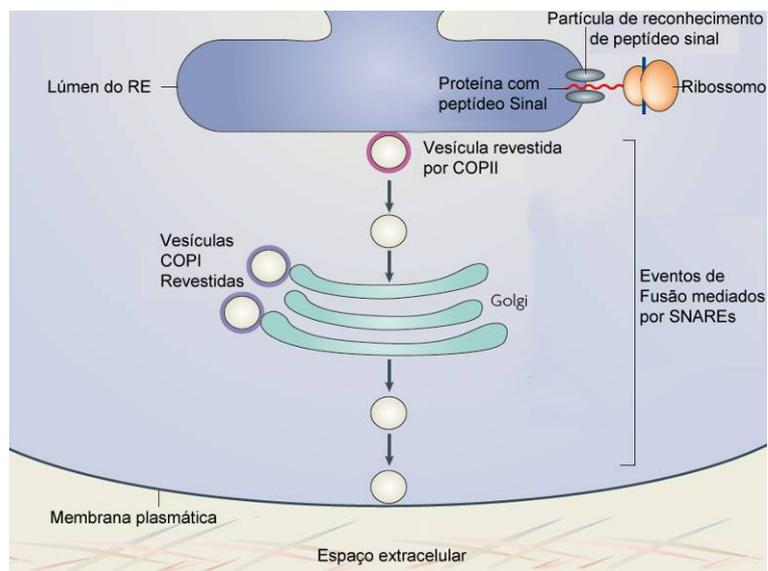
De maneira geral, proteínas possuidoras de peptídeo sinal de secreção são levadas à superfície celular ou ao espaço extracelular através da via de secreção convencional. Estas proteínas entram no RE como proteínas nascentes através da partícula de reconhecimento de peptídeos

sinais. As proteínas recém sintetizadas então saem do RE por domínios de membrana especializados conhecidos como sítios de saída do RE ou sítios tRE, aonde o complexo de revestimento e carregamento de proteínas tipo II (COPII) forma as vesículas. As proteínas vão então para o complexo de Golgi, aonde são modificadas, processadas, separadas e encaminhadas para o seu destino final (NICKEL e RABOUILLE 2009) (Figura 3).

O transporte por vias secretórias depende da formação de outros intermediários vesiculares revestidos, as vesículas revestidas COPI, que são formadas no complexo de Golgi e medeiam o movimento retrógrado e anterógrado de alguns componentes. Este transporte envolve uma série de fusões entre membranas catalisadas por SNAREs (Receptores de proteínas acessórias da proteína de fusão solúvel sensível a N-etilmaleimida), que ocorrem entre intermediários vesiculares e organelas. A fusão entre as vesículas e a membrana plasmática é mediada pela formação de complexos trans-SNARE, sendo que ao término deste processo estes complexos são dissociados e reciclados para o transporte de outras vesículas (MELLMAN e WARREN 2000; MILLER et al. 2003; NICKEL e RABOUILLE 2009) (Figura 3).

Proteínas com peptídeo sinal podem também ser transportadas por vias não convencionais, entre elas pela fusão direta das vesículas do complexo COPII à membrana plasmática. Alternativamente, estas proteínas podem se fundir aos compartimentos endossomais ou lisossomais, que por sua vez se fundem à membrana plasmática. Proteínas podem ainda ser revestidas em vesículas não-COPII que se fundem diretamente à membrana

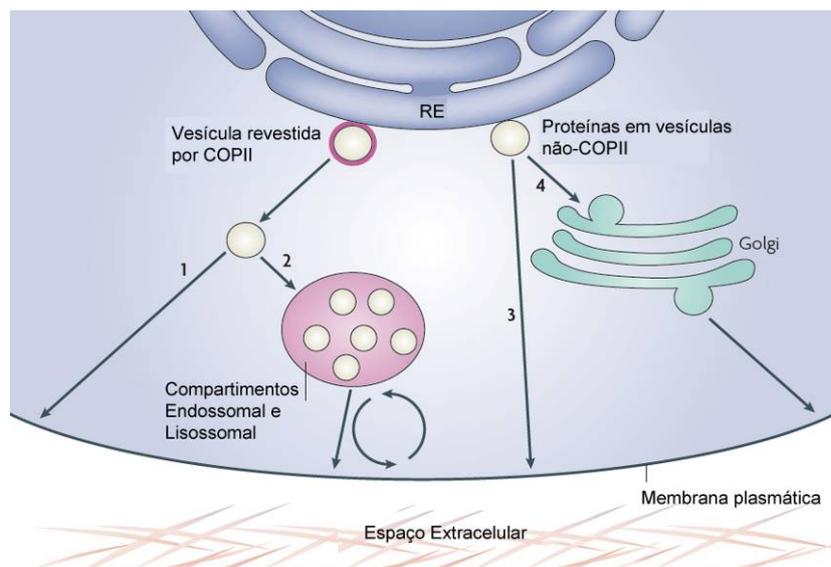
ou ainda que são encaminhadas para o Golgi antes de se fundirem à membrana plasmática (Revisado por NICKEL e RABOUILLE 2009) (Figura 4).



Legenda: Desenho esquemático da via de secreção convencional aonde proteínas contendo peptídeo sinal são liberadas para o lúmen do retículo endoplasmático (RE), sendo então revestidas por complexo de revestimento e carregamento de vesículas tipo II (COPII) e carregadas para o Complexo de Golgi. O transporte destas proteínas ocorre por fusões mediadas por Receptores de proteínas acessórias da proteína de fusão solúvel sensível a N-etilmaleimida (SNAREs) e COPI.

Fonte: Adaptado de NICKEL et al. (2009).

Figura 3 - Via de secreção convencional de proteínas com peptídeo sinal.



Legenda: Desenho esquemático de vias de secreção não convencionais aonde proteínas revestidas pelo complexo de revestimento e carregamento de vesículas tipo II (COPII) podem se fundir diretamente à membrana plasmática (1) ou serem encaminhadas para compartimentos endossomais ou lisossomais sendo então enviadas à membrana plasmática (2). Proteínas podem ainda estar em vesículas não-COPII e serem encaminhadas diretamente à membrana plasmática (3), ou serem encaminhadas ao Golgi sendo então transportadas e fundidas à membrana plasmática (4).

Fonte: Adaptado de NICKEL et al. (2009).

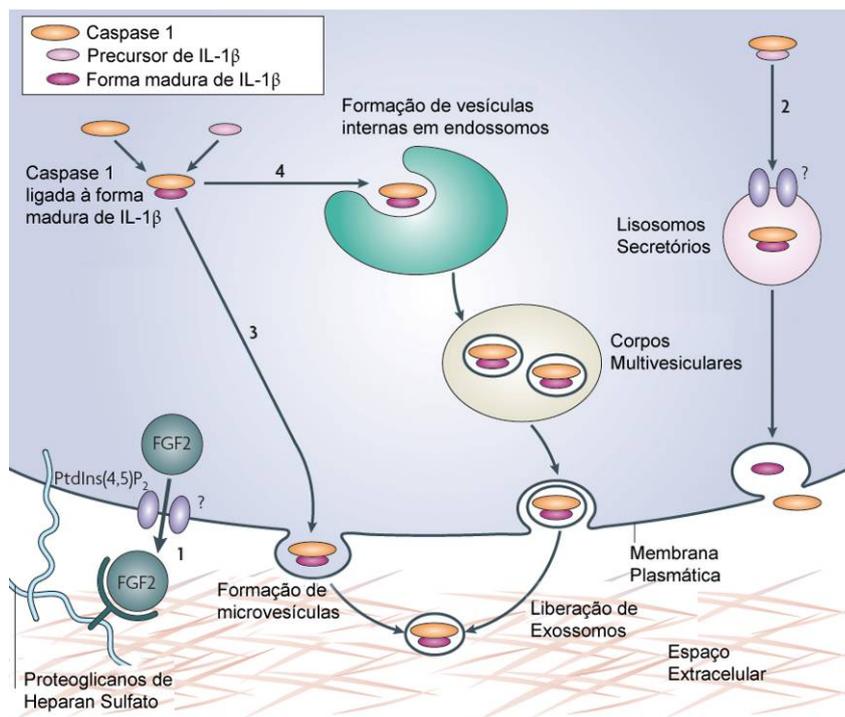
Figura 4 - Vias de secreção não convencionais de proteínas com peptídeo sinal.

Proteínas podem ainda ser secretadas por vias não convencionais. Quatro mecanismos diferentes têm sido propostos. O primeiro é um mecanismo não vesicular no qual proteínas citoplasmáticas, tais como fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2), podem ser diretamente translocadas do citoplasma através da membrana plasmática via participação de fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PtdIns(4,5)P2) e proteoglicanos de heparan sulfato (HPSGs). Os três mecanismos restantes dependem de intermediários vesiculares, sendo ilustrados por exemplo pela secreção de Interleucina 1 β (IL-1 β) com caspase 1, em que estas proteínas

são translocadas para lisossomos secretórios que em um passo seguinte fundem-se à membrana plasmática liberando o conteúdo para o espaço extracelular. A secreção destas proteínas pode ainda ocorrer através da liberação de microvesículas pela membrana plasmática ou da captura das proteínas do citoplasma durante a formação de vesículas endossomais internas, que leva a formação de corpos multivesiculares que são liberados para a face externa da membrana na forma de exossomos (CABY et al. 2005; KELLER et al. 2006; PICCIN et al. 2007; TOTH et al. 2007; NICKEL e RABOUILLE 2009) (Figura 5).

A identificação da participação de vesículas em processos de comunicação intercelular tem sido validado em diversos sistemas biológicos. As vesículas tipo exossomos são melhor conhecidas e têm uma definição mais restrita. Entretanto a definição de vários outros tipos de vesícula como micropartículas (MP), microvesículas (MV), enlargeossomos, ectossomos, iccossomos, prostassomos ou prominossomos ainda não é clara e seus papéis fisiológicos ainda não são completamente compreendidos (COCUCCI et al. 2008; COCUCCI et al. 2009).

Vale ressaltar que PrP^C é secretado por exossomos (FEVRIER et al. 2004; ALAIS et al. 2008). Já a secreção de STI1 ocorre através de uma população de MVs heterogênea quanto a tamanho e composição que entretanto apresentam marcadores clássicos de exossomos, tais como Hsp70 (vide Anexo 4).



Legenda: Desenho esquemático de vias de secreção por um mecanismo não vesicular aonde proteínas citoplasmáticas, como fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2), podem ser diretamente translocadas do citoplasma através da membrana plasmática via fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PtdIns(4,5)P₂) e proteoglicanos de heparan sulfato (HPsGs)(1), translocadas para lisossomos secretórios através de intermediários vesiculares que se fundem à membrana liberando o conteúdo, como na secreção de Interleucina 1 β (IL-1 β) com Caspase 1 (2), liberadas em microvesículas pela membrana plasmática (3) ou capturas do citoplasma durante a formação de vesículas endossomais internas, inserida em corpos multivesiculares e então liberadas para a face externa da membrana na forma de exossomos (4).

Fonte: Adaptado de NICKEL et al. (2009).

Figura 5 - Vias de secreção não convencionais de proteínas solúveis.

1.7 SECREÇÃO DE PROTEÍNAS NO CÂNCER

A avaliação do perfil de secreção de proteínas em células, tecidos ou organismos, denominado secretoma, foi introduzida por TJALSMA et al. (2000) em um estudo aonde se avaliou as proteínas secretadas em *Bacillus*

subtilis. Proteínas secretadas constituem aproximadamente 10% do genoma humano, participando de processos fisiológicos como defesa imune, coagulação sanguínea e sinalização celular, e processos patológicos como angiogênese, diferenciação, invasão e metástases. Estas proteínas podem entrar na circulação, sendo detectáveis em fluidos corporais como sangue e urina (DIAMANDIS 2004; VEENSTRA et al. 2005; QIAN et al. 2006; KOOMEN et al. 2008; PAVLOU e DIAMANDIS 2010).

Apesar da limitação de estudos de secretoma em CC, um estudo envolvendo 21 diferentes linhagens tumorais humanas permitiu a identificação da proteína mediadora da resposta a colapsina tipo 2 (CRMP-2) como um marcador sérico de CC (WU et al. 2008). Pode-se mencionar ainda o estudo que descreve a correlação da secreção de fator trevo tipo 3 (TFF3) e fator de crescimento e diferenciação tipo 15 (GDF15) com a evolução metastática em casos de CC (XUE et al. 2010).

Outro foco tem sido as proteínas secretadas em microvesículas, que podem participar da transferência de moléculas envolvidas na metástase tumoral como citocinas, integrinas, proteases, moléculas angiogênicas (THERY et al. 2002) e até mesmo da transferência horizontal de ácidos nucleicos (BALAJ et al. 2011). As microvesículas, assim, podem ser um compartimento rico em marcadores séricos para cânceres. Dentre as proteínas cuja secreção encontrava-se alterada em CC, pelo menos 1/3 eram secretadas em exossomos, destacando-se as proteínas enolase, fosfoglicerato mutase, triosefosfato isomerase, aldolase, ciclofilina A e cofilina (KLEIN-SCORY et al. 2010).

Apesar do antígeno cancerígeno 19-9 (CA 19-9) ainda ser tido como o melhor marcador sérico disponível para CP (PLESKOW et al. 1989), a especificidade deste marcador, elevado em condições não tumorais como pancreatites, hepatites e obstrução biliar, é questionável (AKDOGAN et al. 2001). Estudos mais recentes têm sugerido o uso conjunto de outras proteínas candidatas a marcadores séricos, tais como o antígeno CD9, Perlecan, fator derivado de células estromais tipo 4, integrina beta-1, Apolipoproteína E (GRONBORG et al. 2006), proteína de ligação fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2 (CHEN et al. 2007), fator deletado em tumores malignos cerebrais tipo 1 (CHEUNG et al. 2008) e metaloproteinase 9 (TIAN et al. 2008).

Já em melanomas podemos mencionar o papel da secreção de CXCL1, 2 e 3 (RICHMOND e THOMAS 1986; HASKILL et al. 1990; ANISOWICZ et al. 1991; BALENTIEN et al. 1991), CXCL8 (COLOMBO et al. 1992), CCL2 (GRAVES et al. 1992), CCL5 (MROWIETZ et al. 1999) e GPX5 (PAULITSCHKE et al. 2009) no crescimento tumoral e/ou modulação imune de células associadas ao tumor. Demonstrou-se ainda que MVs derivadas de melanoma murino B16F10 são capazes de favorecer a formação de metástases deste tumor, possivelmente por diminuir as respostas inflamatórias e/ou antitumorais em um mecanismo dependente de fosfatidilserina (LIMA et al. 2009). Resultados do grupo do Dr. David Lyden em colaboração com nosso grupo mostram que de maneira geral os níveis de exossomos e/ou proteínas em exossomos em pacientes com melanoma é significativamente maior que os observados em pacientes saudáveis, e

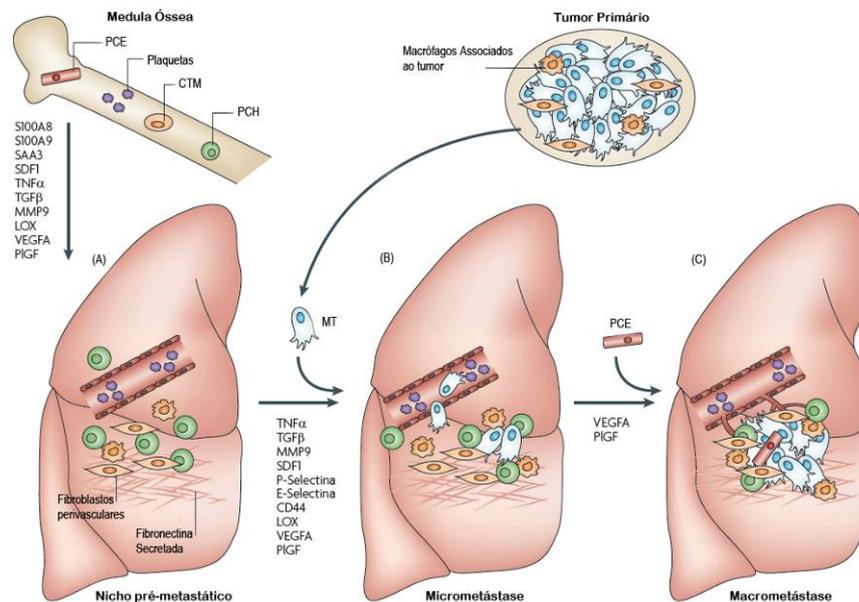
que estes exossomos possuem papel marcante no processo de metástase destes tumores (vide Anexo 2).

1.8 METÁSTASE E SÍTIO PRÉ-METASTÁTICO

O processo de disseminação de células tumorais é tido como a principal causa de mortes relacionadas a cânceres. Apesar disto, pesquisas têm focado predominantemente no desenvolvimento e progressão do tumor em seu sítio primário. Entretanto, um número crescente de estudos têm avaliado os processos envolvidos na formação de metástases tumorais, o que tem resultado no surgimento de conceitos novos e potencialmente revolucionários (COGHLIN e MURRAY 2010).

Dentre estes se destaca o conceito de sítio pré-metastático introduzido em 2005 pelo trabalho de KAPLAN et al. Neste trabalho demonstrou-se que tumores primários sabidamente metastáticos (como melanoma murino B16F10) secretam fatores solúveis que atuam sobre progenitores hematopoiéticos da medula óssea. Sob a ação destes fatores solúveis, populações celulares específicas da medula óssea passam a dirigir-se aos futuros sítios de formação de metástases comuns ao tipo tumoral (ex. pulmões e fígado em modelo de câncer de pulmão de Lewis; e pulmões, fígado, testículos e baço em melanomas B16F10). Tal hipótese foi sustentada por experimentos demonstrando que o tratamento de animais com meio condicionado de uma linhagem altamente metastática

(ex.B16F10) é suficiente para remodelar o perfil de disseminação de linhagens pouco metastáticas



Legenda: (A) Em resposta a fatores secretados pelo tumor primário, incluindo Fator de crescimento de endotélio vascular A (VEGFA), fator de crescimento placentário (PIGF) e Fator de crescimento transformador- β (TGF- β), citocinas inflamatórias como S100 e soro amiloide A3 (sAA3) tem expressão aumentada em sítios pré-metastáticos levando à chegada de progenitores hematopoiéticos derivados da medula óssea (PCH). PCH secretam fatores como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), metaloproteinase 9 (MMP9) e TGF- β . Fibroblastos ativadas, possivelmente derivados de células tronco mesenquimais (CTM), secretam fibronectina e a expressão de lisil oxidase (LOX) é aumentada modificando a matriz extracelular local. (B) Metástases tumorais (MT) se instalam em micrometástases. A expressão sítio-específica de integrinas de adesão como P e E-selectinas pode aumentar a adesão e extravasamento de MT nestes sítios, e interações célula-célula como ligação de CD44 no nicho metastático pode promover a sobrevivência e proliferação de MT. (C) Recrutamento de progenitores endoteliais (PCE) para o sítio metastático desencadeia angiogênese e permite a progressão para macrometástases.

Fonte: Adaptado de PSAILA e LYDEN (2009)

Figura 6 - Modelo da formação do sítio pré-metastático

(ex. câncer de pulmão de Lewis) (KAPLAN et al. 2005). Uma vez nestes tecidos pré-metastáticos, estas células provenientes da medula óssea são capazes de remodelar componentes da matriz extracelular, secretar fatores solúveis, contribuir à formação de novas redes vasculares e de células estromais de forma a tornar este tecido não apenas mais receptivo à chegada de células metastáticas, mas também ao crescimento destas células (PSAILA e LYDEN 2009) (Figura 6).

Neste contexto geral a importância da expressão de PrP^C bem como a expressão e secreção de HOP por células tumorais deve ser explorada. Os dados apresentados pela literatura sugerem que isoladamente estas proteínas podem ter um papel relevante em tumores colorretais, de pâncreas e melanomas. Portanto, é de grande importância determinar de que forma o complexo PrP^C-HOP pode atuar nos processos de proliferação no tumor primário, no estabelecimento do sítio pré-metástático e na formação da metástase.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o papel da interação entre a proteína príon celular (PrP^C) e seu ligante STI1/HOP nos processos de crescimento tumoral e metástases.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a expressão de PrP^C e STI1/HOP em linhagens de tumores de cólon humanos Colo 320DM, Colo 320HSR, HCT8 e WiDr, tumores de pâncreas humanos AsPc-1, BxPc-3, HPAC, Mia-Paca-2 e PANC-1, e melanomas murinos B16F1 e B16F10;
- 2 Medir a secreção de STI1/HOP nas linhagens tumorais supracitadas;
- 3 Identificar o papel *in vitro* da interação entre PrP^C e STI1/HOP na proliferação de linhagens de tumores de cólon humanos HCT8 e WiDr, de pâncreas humanos AsPc-1 e Mia-PaCa-2, e de melanomas murinos B16F1 e B16F10;
- 4 Avaliar se a expressão de PrP^C e HOP apresenta correlação com a proliferação em amostras de tumores humanas de cólon e pâncreas;
- 5 Avaliar a expressão de PrP^C em macrófagos, granulócitos e progenitores hematopoiéticos que participam da formação de sítios pré metastáticos de melanoma murino B16F10;

- 6 Avaliar *in vitro* o papel de STI1 presente em vesículas secretadas por melanomas murinos B16F10 sobre a migração de macrófagos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES E SEU CULTIVO

As linhagens de células tumorais humanas de cólon (Colo 320 DM - ATCC#CCL 220, Colo 320 HSR - ATCC#CCL 220.1, HCT-8 - ATCC#CCL-244 e WiDr - ATCC#CCL-218) e de pâncreas (ASPC-1 - ATCC#CRL-1682, BxPC-3 - ATCC#CRL-1687, HPAC - ATCC#CRL-2119, MIA PaCa-2 - ATCC#CRL-1420 e PANC-1 - ATCC#CRL-1469) e murinas de melanoma B16F1 (ATCC#CRL-6323) e B16F10 (ATCC#CRL-6475) utilizadas neste projeto foram obtidas da ATCC e cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado com Ham F12 (DMEM-F12) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Já a linhagem de macrófagos RAW 264.7 (ATCC#TIB-71) foi cultivada em meio DMEM contendo 10% de SFB. Em todos os casos as células foram mantidas em estufa úmida de CO₂ (5%) a 37° C.

3.2 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para ensaios de migração $2,5 \cdot 10^4$ células da linhagem RAW 264.7 foram semeadas na parte superior de membranas de policarbonato com poros de 8µm (Transwell). Paralelamente, adicionou-se ao meio STI1 recombinante (1µM) ou vesículas de B16F10 tratadas ou não com anticorpos anti-peptídeo 230-245 de STI1 (anti-pep-STI1) (CHIARINI et al.

2002; ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005), anti-PrP^C (LEE et al. 2001) ou imunoglobulina irrelevante. Após 16 horas células da parte superior da membrana foram removidas com a ajuda de uma haste flexível de algodão, tendo sido então as membranas incubadas durante 30 minutos em solução de PBS com solução de 4% paraformaldeído, 0,12M de sacarose em PBS pH 7,4 (PFA) e montadas em solução contendo DAPI (ProLong® gold antifade reagent with DAPI). Células na face inferior da membrana foram então quantificadas em microscópio de fluorescência.

3.3 ENSAIOS *IN VIVO*

Experimentações animais aqui apresentadas foram aprovadas pelo Centro de recursos para pesquisas com animais da Weill Cornell Medical College (Processo número 0709666-A) ou pelo comitê de ética de uso de animais do Hospital AC Camargo (Processo número 044/10). Todos os experimentos descritos envolveram o uso de ao menos 3 animais por grupo experimental.

Camundongos C57bl/6 com idade entre seis e oito semanas receberam inoculação subcutânea no flanco dorsal de 1.10^6 células da linhagem de melanoma murino B16F10 (ATCC#CRL-6475) diluídas em 100µL de PBS. Animais dos grupos controle foram inoculados apenas com 100µL de PBS. Após 1, 2 e 3 semanas da inoculação animais foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano (Aerrane® – Baxter Healthcare corporation), tendo sido então o sangue periférico recolhido por

via retro-orbital e os pulmões perfundidos com PBS e removidos, sendo um dos pulmões fixados durante 24 horas a 4° C em PBS contendo 1,6% de PFA e 20% de Sacarose e congelados em Tissute-Tek OCT e o outro fragmentado e incubado em solução contendo colagenase D (1,2 mg/ml), DNase I (1,5 mg/ml) e Dispase (1,25 mg/ml) por 45 minutos a 37°C. Após este período o tecido digerido foi passado por uma seringa com agulha de 21G e então por um filtro de 40µm, sendo as células filtradas reservadas para experimentos. Paralelamente a medula óssea do fêmur e tibia destes animais foi extraída em solução de PBS + 2mM de EDTA + 1% de albumina sérica bovina (PBS-E) com a ajuda de uma seringa, tendo sido estas células reservadas para ensaios de citometria de fluxo.

Em alguns experimentos, 4 semanas antes da inoculação dos tumores, animais C57bl/6 tiveram suas células da medula óssea transplantadas. Para tal, estes animais foram irradiados (950 rads) e então transplantados por inoculação na veia da cauda de 1.10^6 células provenientes de lavado de medula óssea de animais GFP (animais transgênicos EGFP, C57bl/6-TgN (ActbEGFP)10sb/J – Jackson Laboratory).

Em outros experimentos animais receberam ao longo de 1 mês, 3 vezes por semana, inoculação na veia da cauda de 10µg de vesículas isoladas de meio condicionado de culturas B16F10 (vide item 3.7). Como controle negativo inoculou-se PBS. Após este período animais foram anestesiados pela administração por via inalatória de Isoflurano, tendo então sangue periférico e células da medula recolhidos como supracitado.

3.4 ANÁLISE DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DE PROGENITORES HEMATOPOIÉTICOS

Células do sangue periférico de 3 ou mais animais do mesmo grupo experimental foram tratadas com tampão de lise ACK, centrifugadas e semeadas em triplicata (6.10^5 células/mL) em meio de cultura semissólido para estudo de populações de progenitores hematopoiéticos (Methocult). Paralelamente, lavados de células da medula óssea foram semeados em triplicata (6.10^4 células/mL) neste mesmo meio de cultura. Após 14 dias as unidades formadoras de colônias de progenitores hematopoiéticos nestas culturas foram quantificadas (LAURITI et al. 2009).

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As análises da expressão de PrP^C em pulmões pré-metastáticos de camundongos com melanomas murinos foram realizadas por imunofluorescência. Tecidos previamente fixados montados em Tissute-Tek OCT foram seccionados em cortes de $6\mu\text{m}$ de espessura. Estes cortes foram então incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente em solução de PBS-T e 60 minutos a temperatura ambiente em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (PBS-A). Os tecidos foram incubados durante 60 minutos a temperatura ambiente em PBS-A contendo anticorpos anti-PrP^C (CHIARINI et al. 2002) diluídos 1:100. Em seguida, prosseguiu-se com a incubação por 45 minutos a temperatura ambiente de anticorpo

secundário anti-IgG de camundongo conjugado à Cy-3 diluído 1:1000 em PBS-A. Para coloração dos núcleos, adicionamos solução de DAPI diluído 1:1000. A expressão das proteínas em questão foi então analisada por microscopia de fluorescência.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise quantitativa da expressão de PrP^C nas linhagens celulares estudadas utilizamos a técnica de citometria de fluxo. Para tal, após serem tripsinizadas, células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C durante 1 hora para recuperação de suas estruturas de membrana. Após este período, as células foram incubadas durante 2 horas a 4°C com anticorpo anti-PrP^C 3F4 diluído 1:100 em PBS contendo 0,5% de soro fetal bovino. A seguir, as células foram incubadas durante 1 hora a 4°C com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Ficoeritrina (PE) diluído 1:200 em PBS contendo 0,5% de soro fetal bovino.

Para a análise da expressão de PrP^C e dos marcadores F4/80, Gr1 e CD11b em células da medula óssea, sangue periférico e pulmão de animais com melanoma murino, também utilizamos a técnica de citometria de fluxo. Para tal, as células foram incubadas durante 1 hora a 4°C em anticorpo anti-PrP^C (LEE et al. 2001) diluído 1:100 em combinação com anticorpos conjugados a PE anti-F4/80, anti-Gr1 ou anti-CD11b diluídos em PBS-E. Após este período, as células foram incubadas durante 1 hora a 4°C com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado FITC diluído 1:500

em PBS-E. As células foram então analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur).

3.7 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS DE MEIO CONDICIONADO

Para o isolamento de vesículas secretadas por linhagens de melanoma murino (B16F1 e B16F10), culturas confluentes foram mantidas durante 2 dias no meio de cultura supracitado sem a presença de soro fetal bovino. Após este período, estes meios condicionados foram centrifugados a 500xg por 10 minutos para a remoção de eventuais células não aderidas. O sobrenadante desta centrifugação foi então novamente centrifugado a 13.000xg por 20 minutos para a remoção de eventuais fragmentos celulares. Finalmente, o sobrenadante desta segunda centrifugação foi centrifugado a 100.000xg durante 70 minutos. Ao término desta centrifugação, o precipitado (vesículas) e sobrenadante (fração solúvel) foram isolados para ensaios posteriores.

3.8 ENSAIO DE LIGAÇÃO DE VESÍCULAS A CÉLULAS

Células RAW 264.7 foram semeadas em lamínulas de vidro, permanecendo em cultivo durante 2 horas. Paralelamente, vesículas de B16F10 foram marcadas com o composto fluorescente PKH2 linker. Após serem lavadas, vesículas foram incubadas durante 30 minutos a 37° C com PBS ou em 10ng/μL de anti-pep-ST11, anti-PrP^C ou IgG irrelevante.

Vesículas foram então novamente lavadas e incubadas durante 4 horas com as culturas de células RAW 264.7. Após este período, células foram fixadas, marcadas com DAPI e analisadas para a presença de incorporação de vesículas de B16F10 marcadas.

3.9 SDS-PAGE E ENSAIOS DE “IMMUNOBLOTTING”

Para a análise quantitativa da expressão e secreção de STI1/HOP e PrP^C, extratos proteicos de meio condicionado (frações solúvel e vesículas) e das linhagens celulares mencionadas foram preparados em tampão de amostra (TRIS HCl 0,25M (pH 8) contendo 5% de duodecilsulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol, 1mM de EDTA, 5% de β -mercaptoetanol e 0,1% de Azul de bromofenol), aquecidas a 70°C por 10 minutos e então aplicadas e separadas em gel de eletroforese de poliacrilamida 10% com SDS.

As proteínas do gel foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose durante 30 minutos sob voltagem constante de 100 volts no sistema *Trans-Blot Semi-Dry* em tampão de transferência (39mM de glicina, 48mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Para averiguação da eficiência de transferência usou-se corante Ponceau.

As membranas foram então bloqueadas (durante 2 horas) com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico) e incubadas com anticorpos primários: anti-STI1 (ZANATA et al. 2002) (diluição 1:4000), anti-PrP^C (LEE et al. 2001) (1:1000) e anti-Actina (1:1000). Depois de 3 lavagens com TBST, as

membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho (diluição 1:3000) e anti-IgG de camundongo (diluição 1:3000), dirigidos a anti-STI1 e anti-PrP^C, respectivamente, conjugados com peroxidase em TBST, por 1 hora. Após novas lavagens com TBST, as membranas foram incubadas para revelação com a solução reveladora do *kit ECL Western blotting analysis system* e então expostas a filmes radiográficos (Hyperfilm ECL). Estes filmes foram então revelados e digitalizados, tendo sido as bandas relativas a cada proteína densitometradas pelo software Scion Image.

3.10 MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS EM GEL DE PRATA

Para análise do perfil geral de secreção de proteínas, culturas foram incubadas durante 48 horas em meio sem SFB, e a seguir as células foram contadas e os meios condicionados recolhidos e concentrados em aproximadamente 100x pelo uso de filtro concentrador (Minicon). Após esta etapa, recolheu-se volumes inversamente proporcionais ao número de células presentes nas culturas originais, de forma a manter a mesma relação células/volume e evitar eventuais interferências de quantidade de amostra pelo número de células presente em cultivo durante o carenciamento. Estas amostras foram então preparadas em tampão de amostra, aquecidas a 70°C por 10 minutos e então resolvidas em gel de eletroforese de poliacrilamida 10% com SDS. O gel com as amostras foi então incubado durante 16 horas em solução contendo 50% de metanol,

lavado com água destilada e a seguir incubado por 15 minutos em solução contendo 1,4% de NH_4OH , 0,75mg/ml de NaOH e 8mg/ml de AgNO_3 . Após nova lavagem com água, o gel foi incubado em solução 0,005% de ácido cítrico e 0,0185% de formaldeído até o aparecimento de bandas. Neste ponto, o gel foi incubado durante 15 minutos em solução contendo 45% de metanol e 10% de ácido cítrico, sendo então novamente lavado e analisado.

3.11 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO COM IMUNORREAGENTE MARCADO LIGADO A ENZIMA (ELISA)

A análise da secreção de STI1/HOP de meios condicionados de culturas supracitadas foi realizada através do método de ELISA. Para tal, as culturas foram incubadas durante 48 horas em meio sem SFB, tendo sido então as células contadas e os meios condicionados recolhidos. Os meios de cultura coletados foram então centrifugados a 2000xg por 2 minutos, filtrados e imobilizados durante 12 horas (4°C) em placas de poliestireno. Após este período, seguiu-se com o bloqueio da placa durante 2 horas a 37°C em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico). Em seguida, os antígenos foram imunomarcados com anticorpo anti-STI1 (ZANATA et al. 2002) diluído 1:300 em PBS durante 2 horas a 37°C. Seguiu-se então com a incubação de 1 hora a 37°C com anticorpo secundário contra imunoglobulina de coelho, conjugado a peroxidase, diluído 1:2000 em PBS. A reação foi então revelada por incubação com solução de pH 5,3 contendo 0,4M de Na_2HPO_4 , 0,4M de Ácido Cítrico,

0,045% de Peróxido de Hidrogênio e 1mg/mL de Orto Fenil Diamino, seguida de leitura em espectrofotômetro (490nm). A concentração de STI1/HOP obtida, foi normalizada pelo número de células presentes em cada uma das culturas de onde os meios condicionados foram obtidos.

3.12 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

Após aderirem as placas, células foram mantidas durante 48 horas em DMEM-F12 sem SFB. Tal passo visa sincronizar todas as células da cultura na fase G0 do ciclo celular (SCHORL e SEDIVY 2007). As células foram então cultivadas por 24 horas adicionais em meio contendo 10% de SFB, STI1 recombinante murino, Peptídeo equivalente à região de STI1/HOP que se liga a PrP^C (ELGNDAYKKKDFDKAL) (peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅), peptídeo equivalente à região de PrP^C que se liga a STI1 (GAAAAGAVVGLGGYM) (peptídeo de PrP^C), anticorpo anti-pep-STI1 (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005) e/ou anticorpo anti-PrP^C (LEE et al. 2001).

Para a avaliação da proliferação, 3 horas antes do fim do período de 24 horas acima mencionado, foi acrescida Bromodeoxiuridina (BrdU) ao meio, em uma concentração final de 30µM. Após este período, células são fixadas em paraformaldeído (4% paraformaldeído, 0,12M de sacarose em PBS pH 7,4) durante 20 minutos, e a seguir incubadas por mais 30 minutos em HCl 2N, 10 minutos em tampão borato (0,1M de ácido bórico e 0,15M de NaOH em pH 8,4). Após bloqueio a temperatura ambiente por 1 hora em

PBS-T e 20% de Soro de Cavalos, as células foram incubadas com anticorpo anti-BrdU conjugado a biotina diluído 1:100 durante 12 horas a temperatura ambiente. Em seguida, prosseguiu-se com incubação durante 1 hora a temperatura ambiente de streptavidina conjugada ao fluorocromo Alexa 488 diluída 1:1000 em PBS-T. Para coloração dos núcleos, adicionamos à solução contendo DAPI diluído 1:1000. Núcleos positivos para BrdU foram visualizados por microscopia de fluorescência e quantificados em relação ao número total de células marcadas com DAPI.

3.13 MICRO ARRANJO DE TECIDOS E IMUNOHISTOQUÍMICA

Todas as amostras de adenocarcinoma de pâncreas (68 casos) e de cólon (198 casos) obtidos do banco de tumores do Hospital AC Camargo e/ou da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram revisados para confirmar o diagnóstico e selecionar áreas representativas de tumores para a montagem dos micro arranjos de tecidos (TMAs), compreendendo 1 cilindro de 1mm de diâmetro de cada amostra de tecido. Cortes seriados destes TMAs foram corados com hematoxilina e eosina para confirmação de diagnóstico. Procedimentos experimentais envolvendo amostras humanas foram aprovados pelo comitê de ética do hospital AC Camargo (projeto número 1360/10).

Para marcações os TMAs foram secos por 30 minutos a 37° C, desparafinizados em Xilol e reidratados por incubações consecutivas em soluções de concentrações decrescentes de etanol. Os tecidos foram então

incubados com anti-STI1/HOP (ZANATA et al. 2002) 4,5ng/ μ L, anti-PrP^C (LEE et al. 2001) diluído 1:100 ou anti-Ki67 clone MIB1 diluído 1:100 durante 30 minutos a 37° C e então 16 horas a 4° C. Os tecidos foram então lavados com PBS e incubados com uma mistura de anticorpos secundários anti-IgG de camundongo e anti-IgG de Coelho (Advance HRP Link) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS os tecidos foram incubados com anticorpos terciários conjugados a peroxidase (Advance HRP Enzyme) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS, tecidos foram incubados com solução contendo peróxido de hidrogênio e cromógeno DAB (Substrate-Chromogen (DAB) durante 3 minutos e então contra corados com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film).

Para a análise das marcações em amostras de pâncreas as lâminas foram digitalizadas em equipamento Scanscope e a intensidade de marcação imuno-histoquímica, bem como a contagem de células marcadas e o escore de positividade de cada caso foram analisados de forma automatizada pelo programa analisador de imagens Imagescope. Para a análise de intensidade de marcações de PrP^C e HOP fez-se a quantificação de pixels positivos pelo uso do algoritmo *Positive Pixel Count v*, tendo-se utilizado o valor do índice *Positivity*, que mede a proporção de pixels positivos em relação ao número total de pixels no campo analisado. Em algumas análises as marcações de PrP^C com valor inferior a 0,3, entre 0,3 e

0,4 e superior a 0,4 foram classificadas como +1, +2 e +3, respectivamente, e marcações para HOP com valor inferior a 0,65, entre 0,65 e 0,8 e superior a 0,8 foram classificadas como +1, +2 e +3, respectivamente. Em outras análises, visando minimizar a estratificação das amostras, classificamos a intensidade de marcação de PrP^C como fraca (Inferior a 0,36) e forte (superior a 0,36) e marcações de HOP como fraca (inferior a 0,8) e forte (superior a 0,8). Já a quantificação de proliferação pelo uso do marcador Ki67 foi feita pelo uso do algoritmo *IHC Nuclear v1*, tendo-se utilizado o valor do índice *Intensity value*, que mede a proporção de núcleos positivos em relação ao número total de núcleos no campo analisado.

Já a análise da intensidade das marcações de PrP^C e HOP, classificadas como fracas (+1), moderadas (+2) ou fortes (+3) e o percentual de núcleos positivos para marcação com Ki67 em amostras de adenocarcinomas de cólon foi feita pela patologista Dra Renata Coudry.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios de pelo menos três grupos de experimentos independentes são mostrados, sendo que as barras de erro representam o erro padrão de mensuração. O teste utilizado para comparações múltiplas foi ANOVA seguido de Tukey-HSD. Para comparações entre 2 grupos utilizamos o teste t de student.

Para análises de sobrevida utilizamos o método de Kaplan-Meier seguido pelo teste de logrank. Já para análises de tabelas de contingência

utilizamos o teste de chi-quadrado. Para análises de correlação, após análise da normalidade das amostras, aplicou-se o teste de correlação de Pearson. Considerou-se correlação moderada para valores de R entre 0,3 e 0,6, e fraca quando R estava abaixo de 0,3. Em todas as análises utilizou-se o Software Graphpad Prism.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.

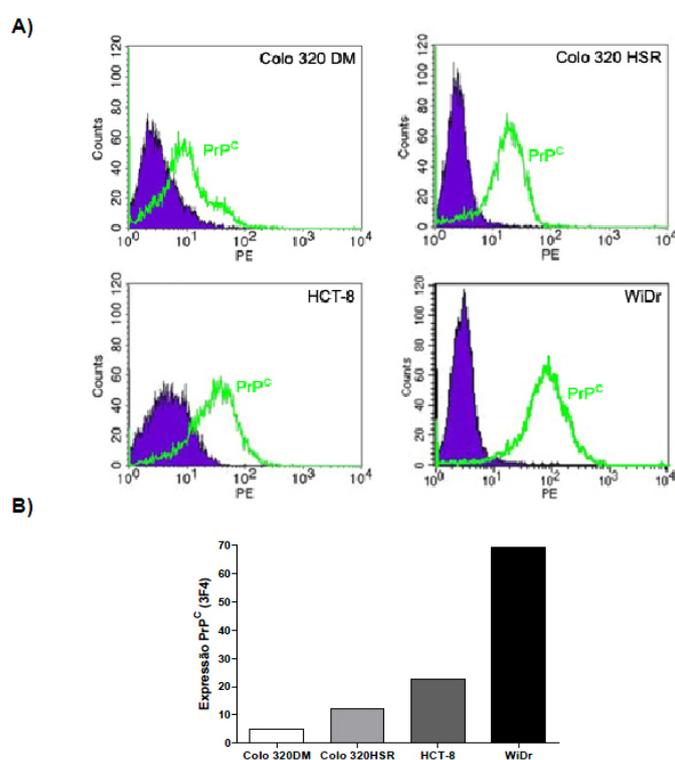
4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PrP^C E HOP EM LINHAGENS DE TUMORES COLORRETAIS E PANCREÁTICOS:

Tendo em mente dados da literatura que descrevem a expressão de PrP^C e HOP em CC e CP (MURRAY et al. 2006; ANTONACOPOULOU et al. 2008; LI C et al. 2009; MCEWAN et al. 2009; WALSH et al. 2009) buscamos, em um primeiro momento, validar um modelo experimental onde se pudesse determinar possíveis efeitos biológicos da interação PrP^C-HOP. Para tal, iniciamos determinando expressão destas moléculas em diferentes linhagens celulares humanas de CC e CP.

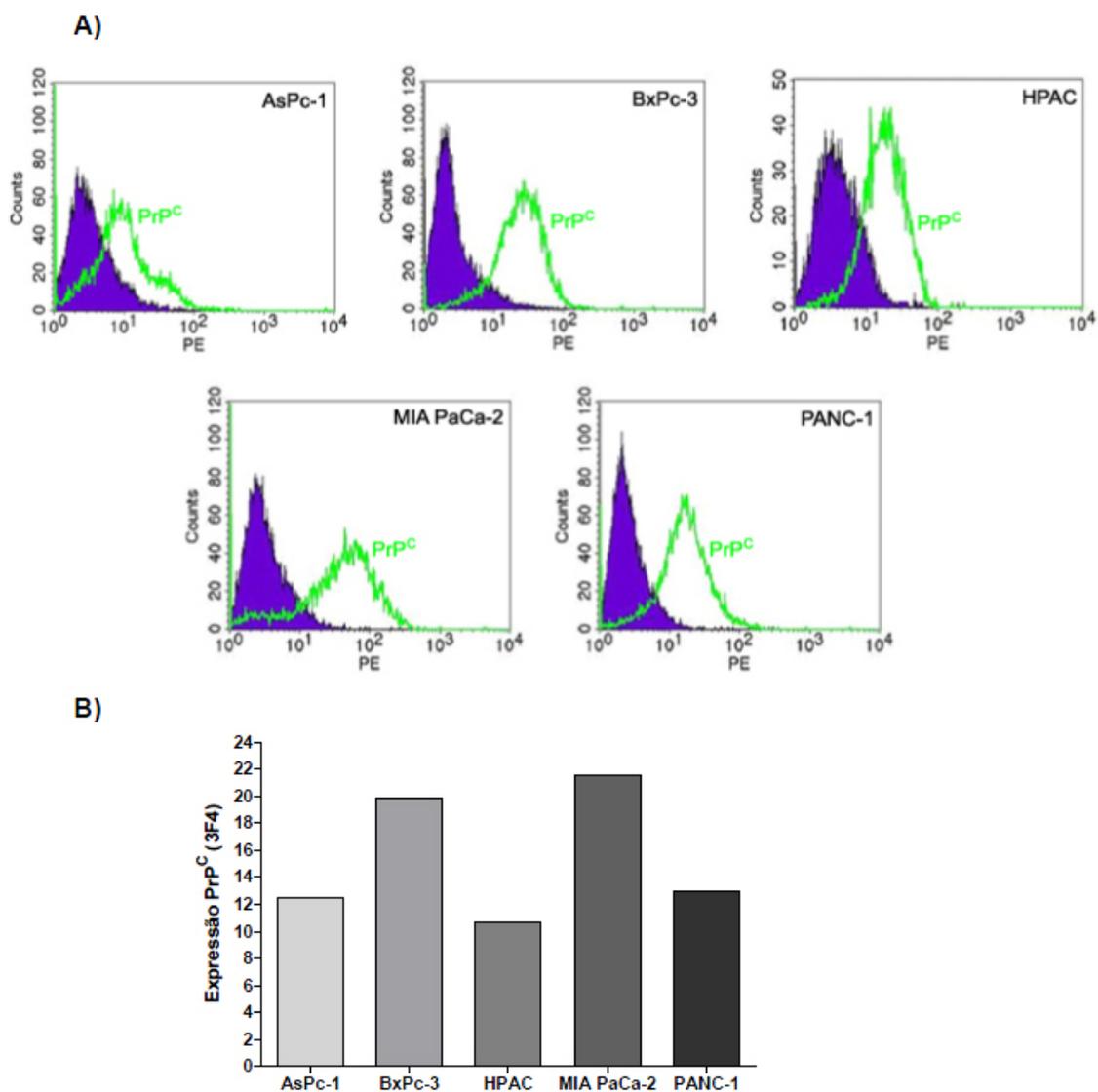
Buscando avaliar eventuais diferenças na expressão de PrP^C na face externa da membrana plasmática, onde é descrita a interação desta molécula com ST11/HOP (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005; ERLICH et al. 2007), realizamos ensaios de citometria de fluxo utilizando células vivas imunomarcadas para PrP^C. Estes experimentos demonstraram que PrP^C é diferentemente expresso entre as linhagens de cólon (Figura 7) e pâncreas (Figura 8) escolhidas. Dentre as linhagens de cólon, a maior expressão de PrP^C na membrana celular foi observada na linhagem WiDr, enquanto que entre as linhagens de pâncreas MIA PaCa-2 e BxPc-3 foram as que apresentaram maior expressão desta proteína.

Em seguida avaliamos se, assim como PrP^C, HOP apresenta expressão diferencial nas linhagens tumorais estudadas. As expressões de HOP e actina (controle de quantidade total de amostra aplicada) foram analisadas em extratos protéicos de linhagens tumorais por imunodeteção (Figura 9). Estas análises demonstraram que, assim como PrP^C, HOP apresenta expressão diferencial entre as linhagens estudadas, sendo que as linhagens de cólon e de pâncreas que apresentam maior expressão de HOP são WiDr e AsPc-1, respectivamente.



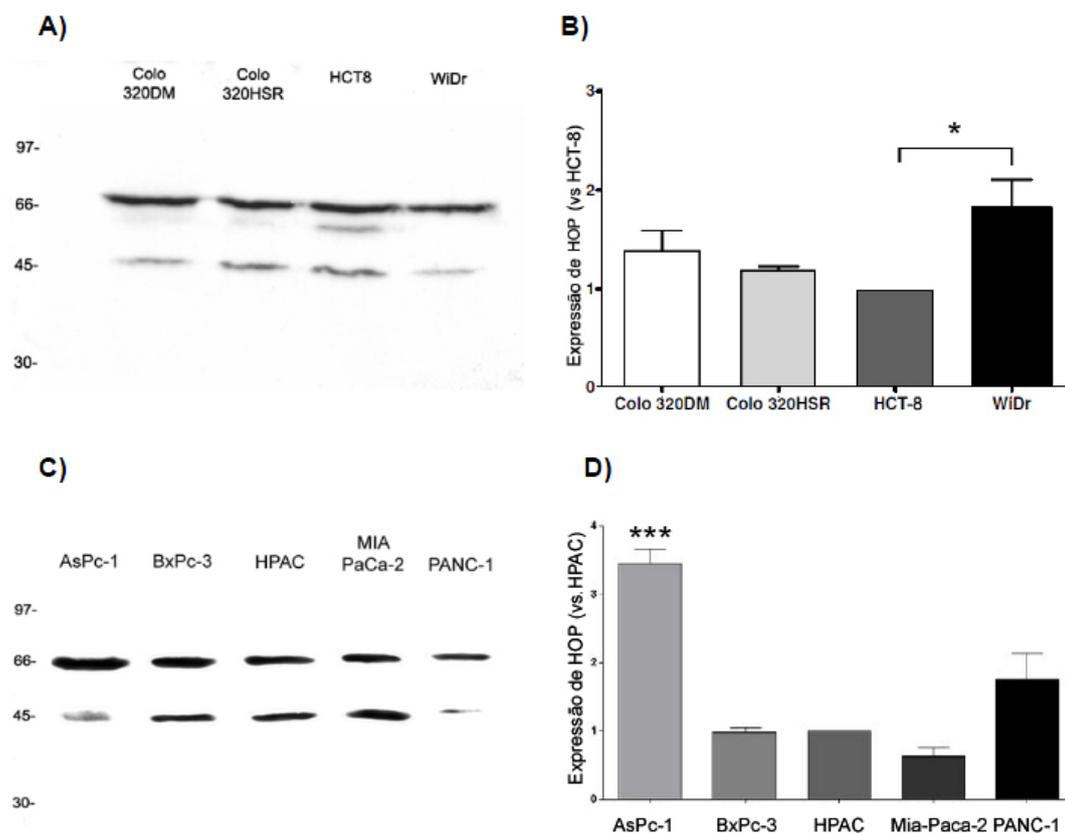
Legenda: (A) Citometria de fluxo em células marcadas para PrP^C; curva verde (anti-PrP^C) curva azul (IgG controle, animal não imunizado) (B) Valores arbitrários da quantificação da área sob a curva das citometrias de fluxo das células marcadas para PrP^C.

Figura 7 - Análise quantitativa da expressão de PrP^C em linhagens de tumor de cólon.



Legenda: (A) Citometria de fluxo em células marcadas para PrP^C; curva verde (anti-PrP^C) curva azul (IgG controle, animal não imunizado) (B) Valores arbitrários da quantificação da área sob a curva das citometrias de fluxo das células marcadas para PrP^C.

Figura 8 - Análise quantitativa da expressão de PrP^C em linhagens de tumor de pâncreas.



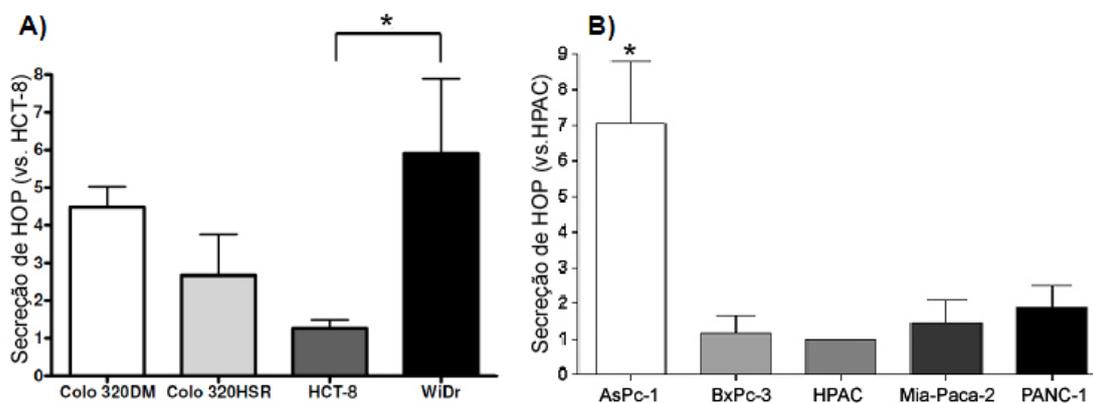
Legenda: Imagem representativa da expressão de HOP em linhagens de tumor de cólon (A) e pâncreas (C) pelo método de Western-Blot. Representação em unidades arbitrárias da expressão de HOP em linhagens de tumor de cólon em relação à linhagem HCT-8 (B) ou em linhagens de tumor de pâncreas em relação à linhagem HPAC (D). Em todos os experimentos a expressão de HOP foi medida pela divisão do valor da densitometria das bandas marcadas com anti-STI1/HOP (66kDa) pelos valores medidos nas bandas marcadas com anti-actina (45kDa) de cada amostra. Dados apresentados representam a média de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Valores mostrados como média \pm erro padrão.

Figura 9 - Análise quantitativa da expressão de HOP em linhagens de tumor de cólon e pâncreas.

4.2 ANÁLISE DA SECREÇÃO DE HOP EM LINHAGENS DE TUMORES COLORRETAIS E PANCREÁTICOS

As possíveis diferenças entre os níveis de expressão e secreção de HOP foram analisadas nas diferentes células de tumores de cólon e de pâncreas. Para tal, as linhagens foram cultivadas durante 48 horas e o meio condicionado avaliado para a presença de HOP através do método de ELISA. Os valores arbitrários de concentração de HOP no meio de cultura foram normalizados pelo número de células em cultura ao término do período de condicionamento.

Estes experimentos demonstraram que os níveis de secreção de HOP (Figura 10) são diretamente proporcionais a expressão celular desta proteína (Figura 9). Portanto, as linhagens celulares que mais expressam HOP, WiDr e AsPc-1, são as que secretam maior quantidade desta proteína.



Legenda: A quantificação de HOP no meio condicionado foi realizada por ensaio de ELISA usando-se anticorpos anti-STI1/HOP. Representação em unidades arbitrárias da secreção de HOP corrigida pelo número de células ao término do período de careciamento em relação à linhagem HCT-8 (A) ou HPAC (B). Dados representam as médias de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Valores mostrados como média \pm erro padrão.

Figura 10 - Análise quantitativa da secreção de HOP em linhagens de tumores de cólon e de pâncreas.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE STI1 NA PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS TUMORAIS DE CÓLON E DE PÂNCREAS

Tendo sido caracterizadas a expressão de PrP^C e a expressão e secreção de HOP, seguiu-se avaliando o potencial papel funcional da interação entre estas proteínas. Levando em conta dados da literatura (ERLICH et al. 2007) que demonstram o papel da interação PrP^C-STI1/HOP na proliferação de células tumorais, iniciamos a avaliação deste mesmo evento em nosso modelo experimental.

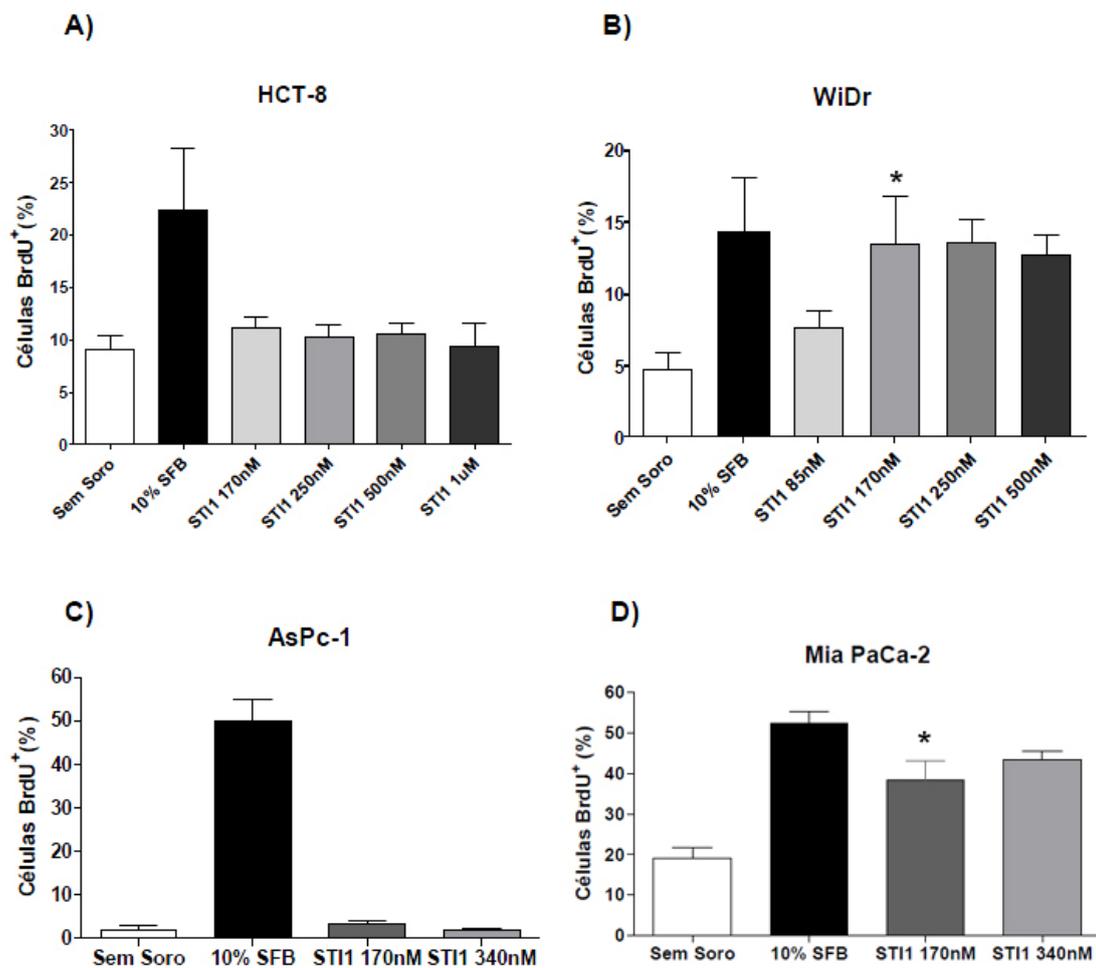
Visando investigar a importância da expressão de PrP^C no estímulo do processo de proliferação celular pela proteína HOP em linhagens tumorais de cólon e de pâncreas, escolhemos células com baixa (HCT-8

entre as linhagens de cólon e AsPc-1 entre as linhagens de pâncreas) e alta (WiDr entre as linhagens de cólon e MIA PaCa-2 entre as linhagens de pâncreas) expressão de PrP^C (Figuras 7 e 8).

As células receberam tratamento com STI1 recombinante na tentativa de mimetizar o estímulo mediado pela HOP secretada. Os resultados aqui mostrados indicam que a expressão de PrP^C parece estar relacionada à resposta proliferativa das células ao estímulo com STI1 recombinante já que, diferentemente das linhagens onde PrP^C é pouco expresso, linhagens com alta expressão desta proteína proliferam sob estímulo de STI1 (Figura 11).

4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DA INTERAÇÃO STI1/HOP-PrP^C NA PROLIFERAÇÃO DAS LINHAGENS DE TUMORES COLORRETAL WiDr E PANCREÁTICO MIA PaCa-2

Uma vez que STI1 recombinante é capaz de estimular a proliferação de células das linhagens humanas de adenocarcinoma colorretal WiDr e de carcinoma pancreático MIA PaCa-2, avaliamos se a interação de STI1/HOP com PrP^C é essencial para esse processo. Para tal, usamos moléculas competitivas ou inibitórias da ligação de STI1 a PrP^C. Para tal foram usados o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ que mimetiza o sítio de ligação de HOP a PrP^C, o peptídeo de PrP^C₁₁₃₋₁₃₂ correspondente ao domínio de PrP^C que interage com HOP e os anticorpos anti-PrP^C e anti-peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅



Legenda: Após carenciamento de 48 horas células foram mantidas durante 24 horas em meio sem soro ou com meio contendo 10% de SFB (Controle positivo) ou STI1 em diferentes concentrações. Após este período procedeu-se com a incubação das culturas durante 3 horas com BrdU, tendo sido as células então fixadas, imunomarcadas com anticorpo contra BrdU e quantificadas para a presença deste marcador. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. Valores mostrados como média \pm erro padrão * $P < 0,05$, grupos tratados com STI1 em relação ao grupo controle.

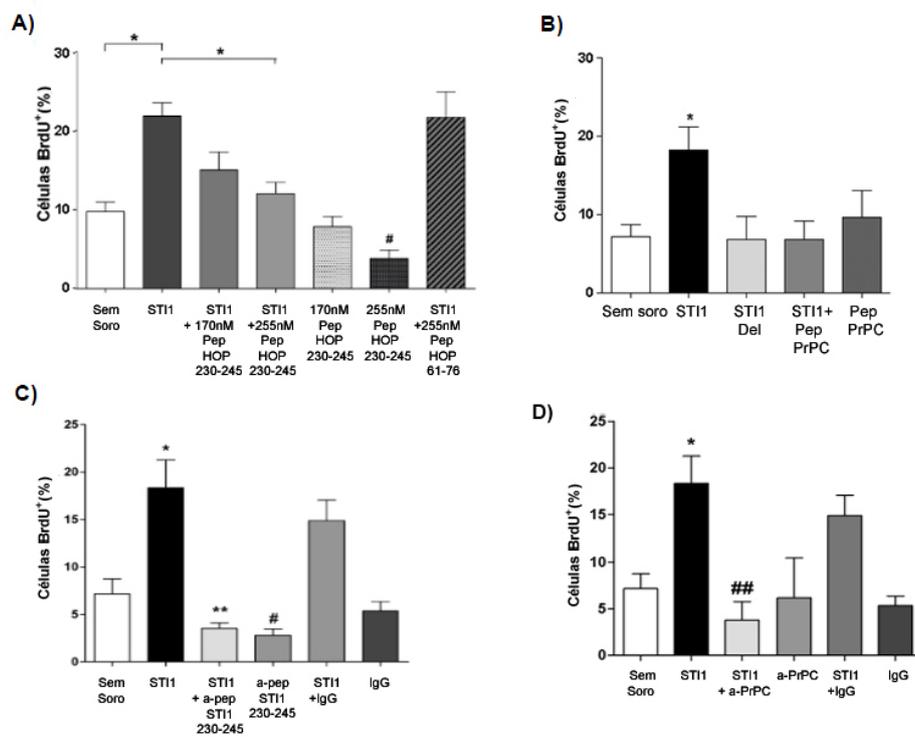
Figura 11 - Efeito de STI1 recombinante murino sobre a proliferação de linhagens tumorais de cólon e de pâncreas.

Na linhagem WiDr o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ foi capaz não apenas de reverter a proliferação estimulada por STI1 aos níveis controle (células não tratadas com STI1), mas ainda de diminuir os níveis basais de proliferação desta linhagem celular. Este segundo achado sugere que o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ é capaz de inibir a ligação da HOP secretada pela própria célula a PrP^C. Observamos ainda ausência de efeito inibitório no tratamento com o peptídeo controle HOP₆₁₋₇₆, reforçando a idéia da especificidade da atividade anti-proliferativa do peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ (Figura 12A).

O anticorpo anti-pep-STI1, semelhantemente ao peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅, é capaz não apenas de reverter a proliferação estimulada por STI1 aos níveis controle, mas também de reduzir de forma significativa os níveis de proliferação do próprio grupo controle. A ausência de efeito de IgG controle (proveniente de animais não imunizados) sobre a proliferação garante a especificidade da atividade anti-proliferativa do anticorpo anti-pep-STI1 (Figura 12C).

De forma a confirmar a participação de PrP^C neste processo, utilizamos tratamentos com um peptídeo que mimetiza a região de PrP^C que interage com STI1 (PrP^C₁₁₃₋₁₃₂), com um anticorpo anti-PrP^C e ainda com uma molécula recombinante de STI1 deletada do sítio entre os aminoácidos 230 e 245, que participa da interação com PrP^C (STI1 del). Nestes tratamentos pudemos observar que ambos competidores e inibidores foram capazes de reverter os efeitos proliferativos produzidos por STI1 recombinante. Além disso, STI1 del foi incapaz de reproduzir os efeitos

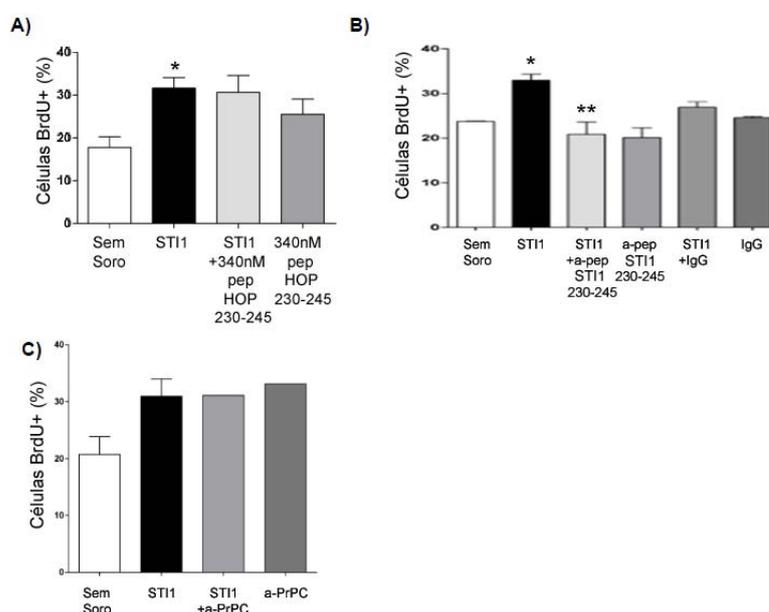
proliferativos produzidos por essa molécula em sua forma íntegra (Figura 12B e D).



Legenda: Células WiDr em meio sem soro (Controle) ou ST11 (170nM). A estes meios foram adicionados peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo controle (HOP₆₁₋₇₆) (A), ST11 deletado da região entre os aminoácidos 230-245 (ST11del) (B), Peptídeo PrP^C₁₁₃₋₁₃₂ (Pep PrP^C) (B), anticorpos anti-ST11₂₃₀₋₂₄₅ (anti-pep-ST11) ou imunoglobulina controle de coelho (IgG), (C) ou anticorpos anti-PrP^C ou imunoglobulina controle de camundongo (IgG) (D). Células positivas para BrdU foram quantificadas. Valores mostrados como média \pm erro padrão. (A)*P<0,05, grupo tratado com ST11 X grupos controle e tratado com ST11 e peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅, # P<0,05, grupo tratado com peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ X controle; (B) *P<0,05, grupo tratado com ST11 X grupo controle e grupo tratado com ST11 e peptídeo de PrP^C, (C)*P<0,05, grupo tratado com ST11 X grupo controle, **P<0,01, grupo tratado com ST11 e anti-pep-ST11 em relação ao grupo tratado apenas com ST11, ##P<0,05, grupo tratado com anticorpo anti-peptídeo ST11₂₃₀₋₂₄₅ em relação ao grupo controle; (D)*P<0,05, grupo tratado com ST11 X grupo Controle, ###P<0,01, grupo tratado com ST11 e anti-PrP^C X grupo tratado apenas com ST11. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 12 - Efeito de ST11, peptídeos competidores e anticorpos inibitórios da interação PrP^C-HOP na proliferação da linhagem de adenocarcinoma colorretal humano WiDr.

Quanto a linhagem MIA PaCa-2 observamos que a competição da interação PrP^C-HOP ou a inibição de PrP^C com o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ ou com o anticorpo anti-PrP^C, respectivamente, não foram capazes de reduzir a proliferação induzida por STI1 recombinante (Figura 13A e C). Por outro lado, o inibidor que atua diretamente sobre STI1 (anticorpo anti-pep-STI1) bloqueou os efeitos proliferativos promovidos por STI1 recombinante (Figura 13B).



Legenda: Após carenciamento de 48 horas, células MIA-PaCa-2 foram mantidas durante 24 horas em meio sem soro (controle) ou com STI1 (170nM). A estes meios foram adicionados peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ (A), anticorpos anti-STI1₂₃₀₋₂₄₅ (Anti-pep-STI1) ou Imunoglobulina de coelho Controle (IgG) (B) ou anticorpos anti-PrP^C (C). Após este período células positivas para BrdU foram quantificadas. Valores mostrados como média \pm erro padrão. (A)*P<0,05, grupo tratado com STI1 X grupo controle; (B)*P<0,05, grupo tratado com STI1 X grupo controle, **<0,01, grupo tratado com STI1 e anticorpo anti-pep-STI1 X grupo tratado apenas com STI1. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 13 - Efeito de STI1, peptídeos competidores e anticorpos inibitórios da interação PrP^C-HOP na proliferação da linhagem de carcinoma pancreático humano MIA-PaCa-2.

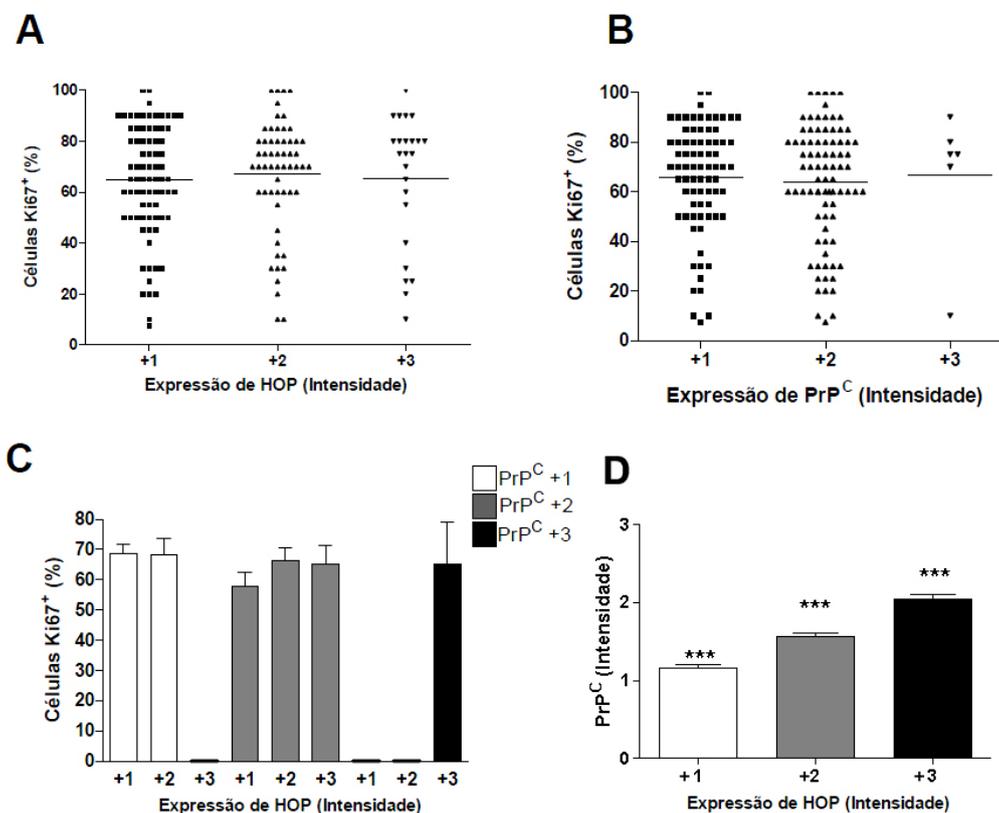
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP^C E HOP EM TECIDOS DE TUMORES COLORRETAIS E PANCREÁTICOS E SUA CORELAÇÃO COM A PROLIFERAÇÃO

Tendo em mente dados *in vitro* sugerindo que a expressão de HOP é proporcional à secreção desta proteína em linhagens de CC e CP (Figuras 9 e 10) e que STI1/HOP quando secretada é capaz de induzir a proliferação destas células via mecanismos dependentes (Figura 12) ou não de PrP^C (Figura 13), buscamos avaliar tais hipóteses em amostras de pacientes portadores destes tumores.

No caso dos CC observamos que tanto a expressão de HOP (Figura 14A) quanto de PrP^C (Figura 14B) parece não apresentar relação com o estado de proliferação celular (percentual de células positivas para Ki67) destes tumores. Outro achado refere-se à observação de que a intensidade de expressão de PrP^C parece não apresentar influencia sobre a relação entre a expressão de HOP e o grau de proliferação destes tumores (Figura 14C). Observamos ainda que, semelhantemente ao observado em experimentos *in vitro*, a expressão de PrP^C parece estar relacionada à expressão de HOP (Figura 14D).

Além disso, vimos que a expressão de HOP e PrP^C parece não apresentar modificações relevantes quanto os parâmetros demográficos e anatomopatológicos disponíveis (Quadro 1). A única exceção refere-se ao dado sugerindo que tumores colorretais indiferenciados ou pouco diferenciados tendem a expressar baixos níveis de PrP^C. Entretanto

consideramos que este achado não apresenta clara relevância quanto a biologia destes tumores.



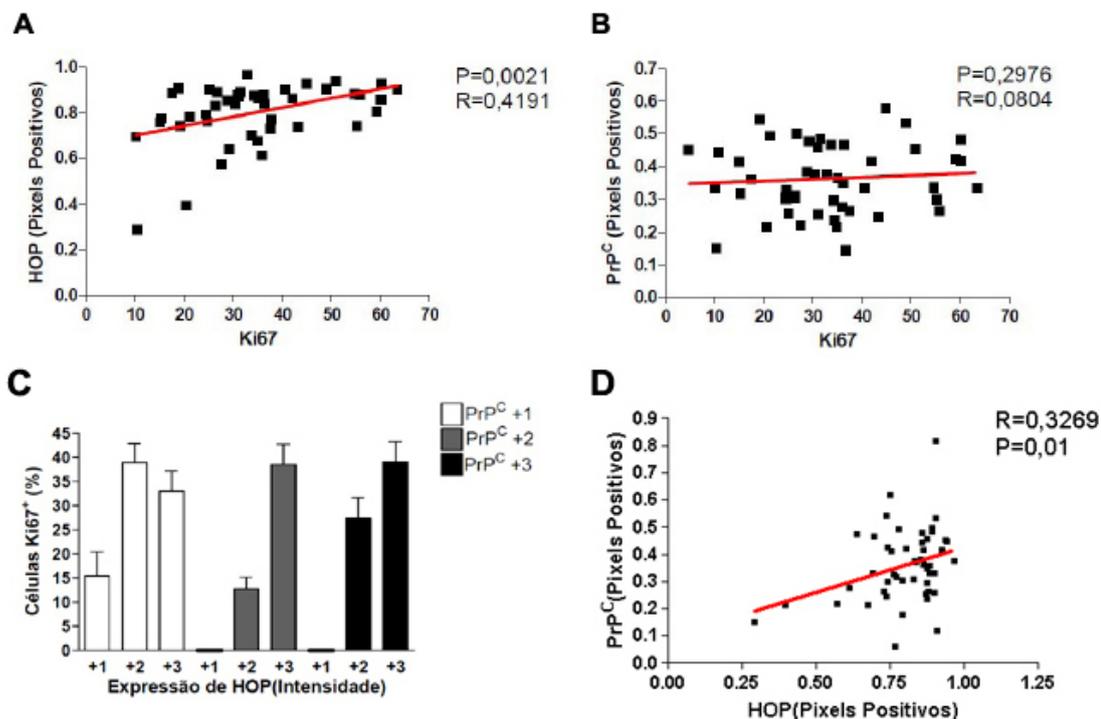
Legenda: TMAs compostos de amostras de adenocarcinomas de cólon foram marcados para PrP^C, HOP ou Ki67. A intensidade das marcações é expressa em Fraca (+1), Moderada (+2) ou Forte (+3). Análise da proporção de células positivas para Ki67 em relação à intensidade de expressão de HOP (A), PrP^C (B) ou destas duas moléculas em conjunto (C). Análise da relação entre a intensidade de expressão de PrP^C e HOP (D), ***P<0,01, expressão de PrP^C em relação aos diferentes graus de intensidade de HOP. Análise estatística por ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 14 - Análise da expressão de HOP, PrP^C e Ki67 em TMAs de tumores colorretais.

Quadro 1 – Dados demográficos dos pacientes e anatomopatológicos dos tumores de colorretais usados na confecção do micro arranjo de tecidos quanto a expressão de HOP e PrP^C.

	HOP Fraco	HOP Moderado	HOP Forte	P	PrP ^C Fraco	PrP ^C Moderado	P
Idade							
<60 anos	30 (21%)	22 (16%)	8 (7%)	0,8522	45 (27%)	19 (12%)	0,3632
>60 anos	30 (21%)	33 (24%)	16 (11%)		77 (47%)	23 (14%)	
Gênero							
Masculino	47 (30%)	27 (17%)	8 (5%)	0,1496	68 (40%)	19 (15%)	0,1637
Feminino	33 (21%)	28 (18%)	14 (9%)		55 (33%)	26 (12%)	
Invasão Vascular							
Sim	3 (1%)	7 (3%)	3 (1%)	0,1220	8 (5%)	5 (3%)	0,2462
Não	77 (48%)	49 (31%)	20 (16%)		115 (68%)	40 (24%)	
Invasão Perineural							
Sim	74 (46%)	47 (30%)	20 (12%)	0,2879	110 (65%)	38 (23%)	0,2631
Não	6 (4%)	9 (6%)	3 (2%)		13 (8%)	7 (7%)	
Estádio T							
T1	7 (4%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0,5271	8 (5%)	2 (1%)	0,9257
T2	11 (7%)	6 (4%)	4 (2,5%)		16 (10%)	5 (3%)	
T3	55 (34%)	41 (26%)	15 (10%)		84 (50%)	32 (19%)	
T4	7 (4%)	8 (5%)	4 (2,5%)		14 (8%)	6 (4%)	
Estádio N							
N0	49 (31%)	23 (15%)	14 (9%)	0,0673	67 (40%)	18 (11%)	0,1002
N1/N2	29 (18%)	31 (20%)	10 (7%)		54 (33%)	26 (16%)	
Estádio M							
M0	66 (45%)	39 (27%)	20 (14%)	0,6816	101 (60%)	35 (21%)	0,3790
M1/M2	11 (7%)	8 (5%)	2 (2%)		22 (13%)	11 (6%)	
Grau Tumoral							
I	16 (10%)	4 (2,5%)	4 (2,5%)	0,4822	22 (14%)	3 (2%)	0,2619
IIA	27 (17%)	16 (10%)	7 (4%)		38 (23%)	14 (8%)	
IIB	2 (1%)	2 (1%)	2 (1%)		4 (2%)	2 (1%)	
IIIA	1 (0,5%)	2 (1%)	1 (0,5%)		2 (1%)	0 (0%)	
IIIB	13 (8%)	7 (4%)	5 (3%)		23 (13%)	6 (4%)	
IIIC	8 (5%)	8 (5%)	3 (1,5%)		12 (7%)	9 (5%)	
IV	14 (9%)	17 (10%)	3 (1,5%)		22 (13%)	11 (7%)	
Diferenciação							
Indiferenciado/ Pouco Diferenciado	72 (45%)	45 (28%)	20 (12%)	0,2813	112 (67%)	32 (19%)	0,0025
Diferenciado	7 (4%)	10 (7%)	3 (4%)		11 (6%)	12 (8%)	

Legenda: Dados demográficos e anatomopatológicos dos pacientes e de seus respectivos tumores colorretais. Expressão de HOP e PrP^C em relação a dados de idade, gênero, invasão vascular e perineural, estádios T, N e M, grau tumoral e diferenciação. Estádio referente à classificação TNM (GUNDERSON et al. 2010, CUNNINGHAM et al. 2010). Análise estatística por teste de chi-quadrado.



Legenda: TMAs compostos de adenocarcinomas de pâncreas foram marcados para PrP^C, HOP ou Ki67. A intensidade das marcações é expressa em pixels positivos para o caso de PrP^C e HOP e em percentual de núcleos positivos em Ki67. (A, B e D), análises de correlação: após análise da normalidade das amostras, aplicou-se o teste de correlação de Pearson, aonde se considerou correlação moderada para valores de R entre 0,3 e 0,6 e fraca quando abaixo de 0,3. (C) análise da proporção de células positivas para Ki67 em relação à intensidade de expressão de PrP^C e HOP, aonde marcações para PrP^C com valor inferior a 0,3, entre 0,3 e 0,4 e superior a 0,4 foram classificadas como +1,+2 e +3, respectivamente, e marcações para HOP com valor inferior a 0,65, entre 0,65 e 0,8 e superior a 0,8 foram classificadas como +1,+2 e +3, respectivamente.

Figura 15 - Análise da expressão de HOP, PrP^C e Ki67 em TMAs de adenocarcinomas de pâncreas.

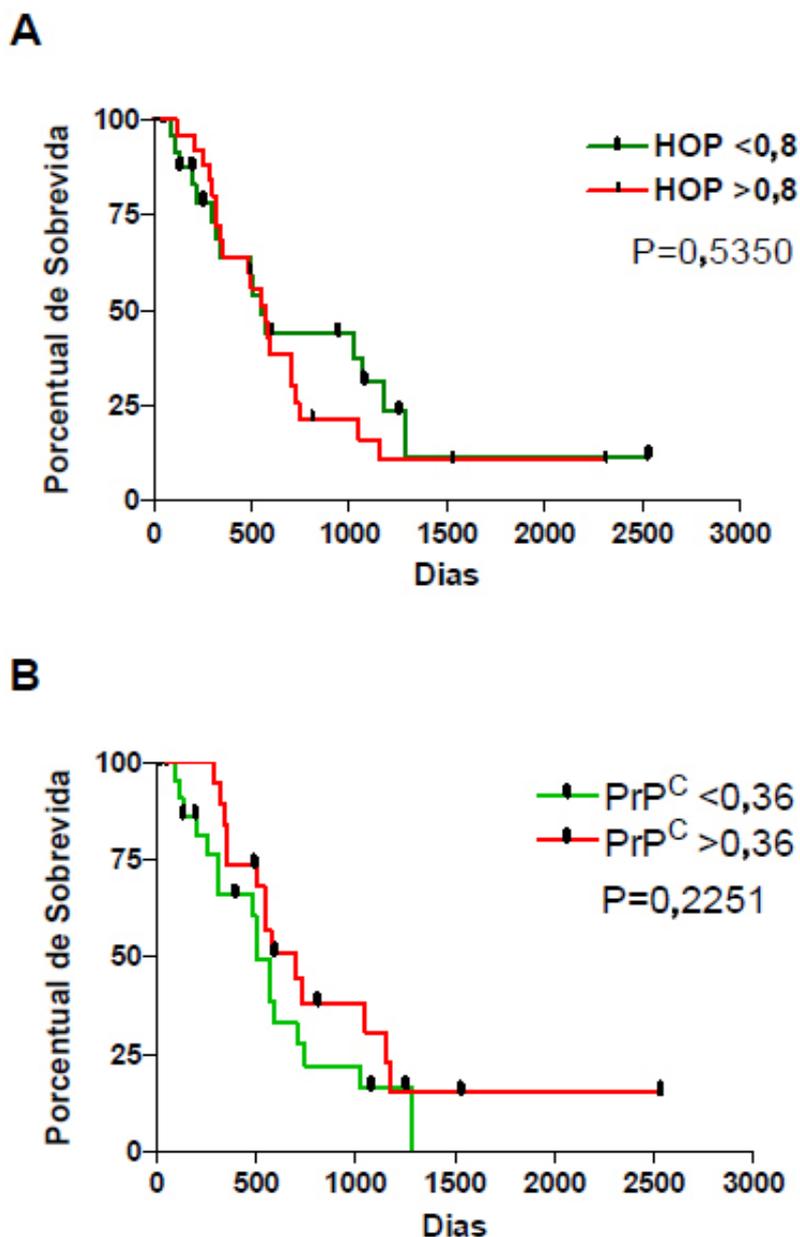
Já as análises envolvendo CP demonstraram que a expressão de HOP apresenta correlação com a proliferação destes tumores (Figura 15A), enquanto que nenhuma correlação foi encontrada entre a proliferação e a expressão de PrP^C (Figuras 15B e C). Estes achados reforçam os dados obtidos *in vitro* com a linhagem MIA-PaCa-2, onde STI1 recombinante aumenta a proliferação e seu bloqueio inibe a proliferação de maneira independente de PrP^C (Figura 13). Semelhantemente aos dados de CC a expressão de HOP e PrP^C parecem estar relacionadas (Figura 15D).

Observamos ainda que a expressão de HOP e PrP^C parece não apresentar modificações relevantes em relação a parâmetros como: idade, gênero, invasão vascular, invasão perineural, Estádio T, Estádio N, Tamanho do tumor, Diferenciação (Quadro 2) e sobrevida (Figura 16).

Quadro 2 – Dados demográficos dos pacientes e anatomopatológicos dos tumores de pâncreas usados na confecção do micro arranjo de tecidos quanto a expressão de HOP e PrP^C.

	HOP Fraco	HOP Forte	P	PrP ^C Fraco	PrP ^C Forte	P
Idade						
<60 anos	16 (28%)	16 (28%)	0,3146	13 (28%)	13 (28%)	0,5521
>60 anos	10 (17%)	15 (27%)		11 (23%)	10 (21%)	
Gênero						
Masculino	14 (24%)	20 (35%)	0,2921	16 (34%)	12 (25%)	0,4966
Feminino	12 (21%)	11 (20%)		10 (21%)	9 (20%)	
Invasão Vascular						
Sim	7 (12%)	10 (17%)	0,7745	8 (15%)	7 (14%)	1,000
Não	19 (33%)	21 (38%)		18 (37%)	15 (34%)	
Invasão Perineural						
Sim	22 (37%)	28 (47%)	0,2851	22 (47%)	15 (32%)	0,3064
Não	6 (10%)	3 (6%)		4 (9%)	6 (12%)	
Estádio T						
1	3 (6%)	2 (4%)	0,8114	2 (4%)	2 (4%)	0,5760
2	5 (8%)	6 (12%)		6 (14%)	3 (7%)	
3	17 (31%)	21 (39%)		15 (33%)	17 (38%)	
Estádio N						
0	13 (23%)	11 (19%)	0,2689	11 (23%)	10 (21%)	0,9710
1	13 (23%)	20 (35%)		14 (29%)	13 (27%)	
Tamanho Tumor (cm)						
<4	16 (27%)	15 (26%)	0,2655	12 (24%)	13 (26%)	0,4687
≥4	10 (18%)	17 (29%)		14 (28%)	10 (22%)	
Diferenciação						
Indiferenciado / Pouco Diferenciado	23	32	0,1968	25	22	0,9294
Diferenciado	3	1		1	1	

Legenda: Dados demográficos e anatomopatológicos dos pacientes e de seus respectivos tumores de pâncreas. Expressão de HOP e PrP^C em relação a dados de idade, gênero, invasão vascular e perineural, estádios T e N, tamanho do tumor e diferenciação. Análise estatística por teste de chi-quadrado.



Legenda: TMAs compostos de adenocarcinomas de pâncreas foram marcados para PrP^C, HOP. Dados de sobrevida de pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas foram plotados em relação ao nível de expressão de HOP (A) e PrP^C (B). Amostras foram divididas em 2 grupos quanto à intensidade de expressão de HOP (menor que 0,8 como fraco e maior que 0,8 como forte) e PrP^C (menor que 0,36 como fraco e maior que 0,36 como forte). Gráficos montados pelo método de Kaplan-Meier e analisados pelo teste de Logrank.

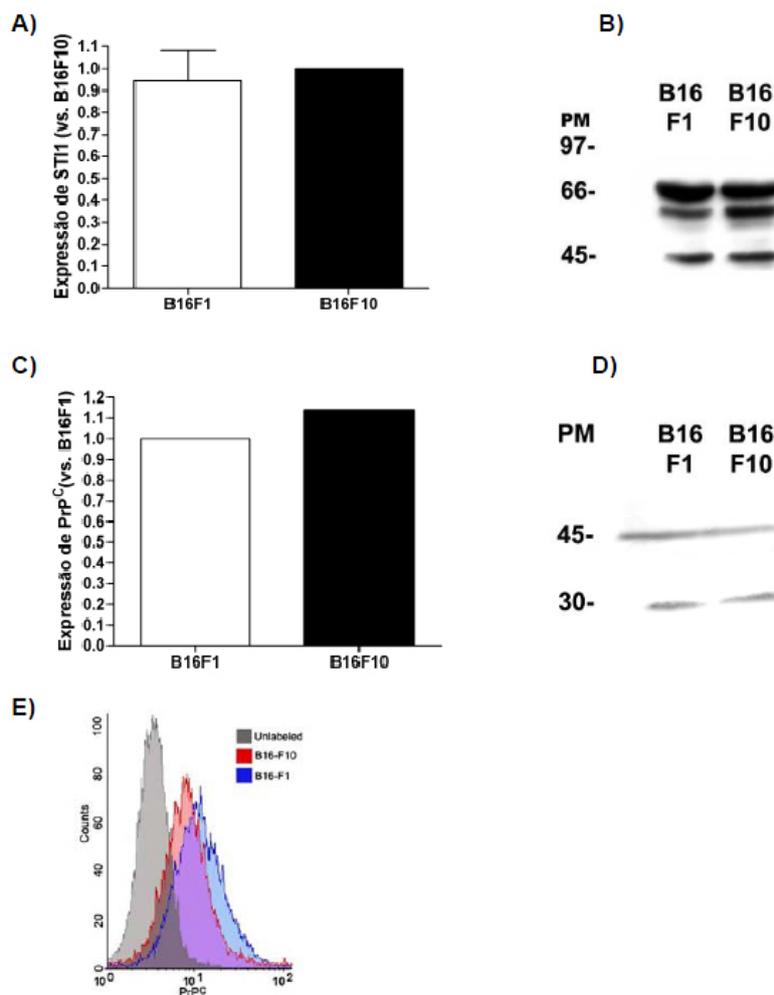
Figura 16 – Dados de sobrevida de pacientes com adenocarcinoma de Pâncreas em relação à expressão de HOP e PrP^C.

4.6 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE STI1/HOP DERIVADO DE TUMORES E PrP^C NO PROCESSO DE METÁSTASE TUMORAL

Dados da literatura identificaram que proteínas secretadas por células tumorais podem participar do estabelecimento de nichos pré-metastáticos (KAPLAN et al. 2005). Os dados apresentados nesta tese mostram que HOP é secretada por linhagens celulares de tumores colorretais e pancreáticos e é capaz de promover a proliferação destas células *in vitro*. Além disso, a expressão de HOP em tecidos de tumores de pâncreas está associada positivamente com a proliferação destes tumores. Desta forma pareceu-nos importante avaliar de que forma a secreção de HOP/STI1 por células tumorais poderia atuar sobre células não tumorais e participar de processos como o da formação de nichos pré-metastáticos.

Visto que a formação do nicho pré-metastático envolve o recrutamento de células do sistema imune (KAPLAN et al. 2005), modelos tumorais de células humanas não são adequados uma vez que requerem o uso camundongos imunodeficientes. Desta forma, escolhemos como modelo de estudo um conjunto de células de melanoma de camundongo das quais uma é pouco metastática (B16F1) e outra muito metastática (B16F10) (RAY et al. 1999; SHIBATA et al. 2006).

Iniciamos a caracterização da expressão e da secreção de STI1 e PrP^C em B16F1 e B16F10. STI1 e PrP^C são expressas em níveis semelhantes nessas duas linhagens (Figura 17 A-D). A expressão de PrP^C na membrana também é semelhante em ambas as linhagens (Figura 17E).



Legenda: Representação da expressão de STI1 em unidades arbitrárias (A) e PrP^C (C), normalizadas pela expressão de actina em relação a linhagem B16F1. Imagem representativa da expressão de actina (bandas de 45kDa), STI1 (B – bandas de 66kDa) e PrP^C (D – bandas de 30kDa) nestas linhagens pelo método de Western-Blot. Citometria de fluxo em células B16F1 (curva azul) e B16F10 (curva vermelha) marcadas para PrP^C. Curva cinza representa células incubadas com IgG controle (E).

Figura 17 - Análise quantitativa da expressão de STI1 e PrP^C em linhagens de melanoma murino.

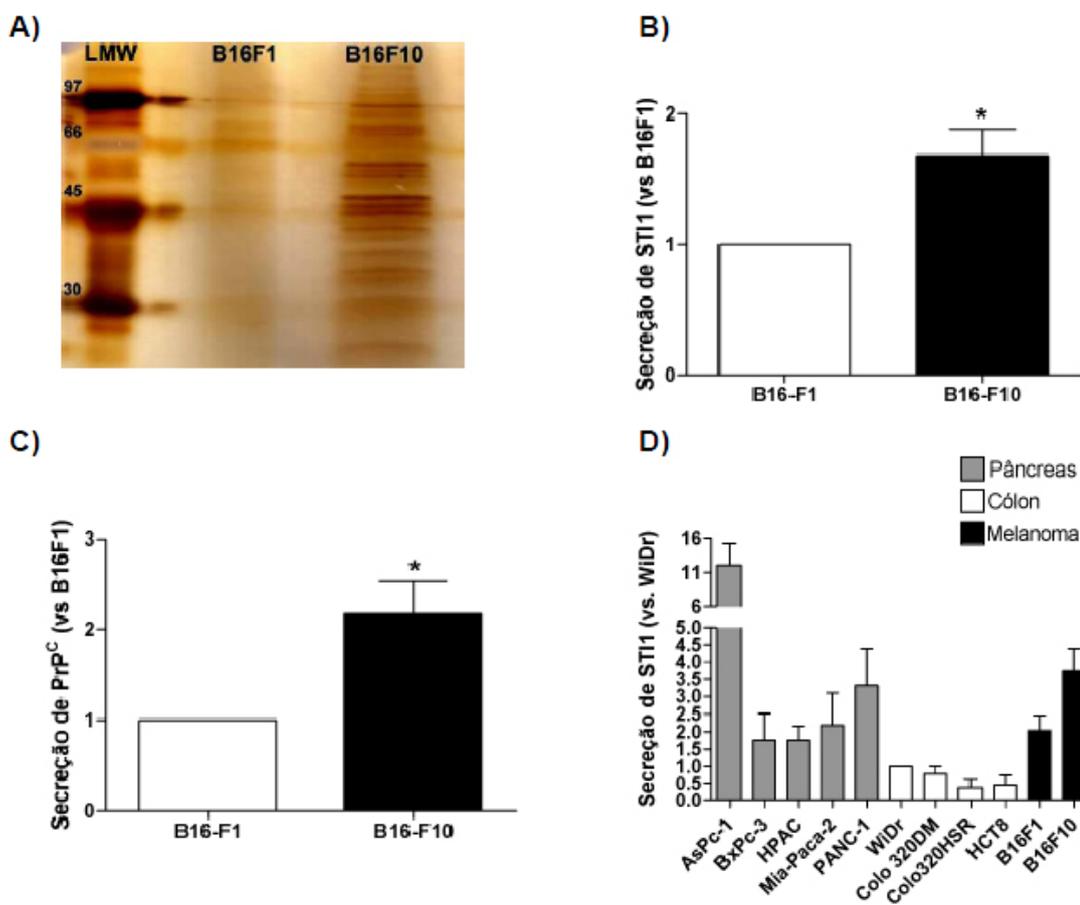
Entretanto, a análise do perfil de secreção destas duas linhagens revelou que B16F10 parece secretar uma quantidade maior de proteínas do que B16F1 (Figura 18A). Dentre estas, observamos que tanto STI1 quanto PrP^C são secretadas em maiores concentrações em B16F10 do que em

B16F1 (Figura 18B e C). Ao normalizarmos estes dados com os obtidos nas linhagens de tumores de cólon e pâncreas, tendo a linhagem WiDr como controle, constatamos que os níveis de secreção de STI1/HOP em linhagens de melanoma são comparáveis aos observados nas linhagens de tumores de pâncreas, conhecidamente mais metastáticas (Figura 18D).

Observamos ainda que a proliferação das células B16F1 ou B16F10 não é modificada em resposta a tratamentos com STI1 recombinante. Além disso, tratamentos com anticorpo anti-pep-STI1 não foram capazes de influenciar a proliferação desta célula (Figura 19).

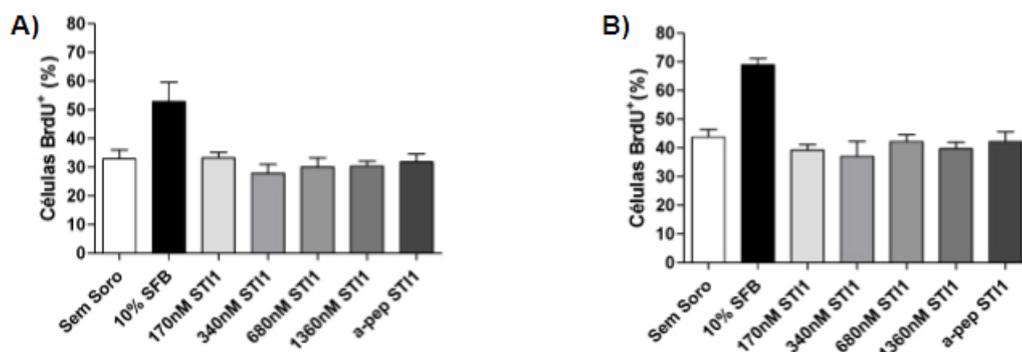
Ao iniciarmos a colaboração com o grupo do Dr. David Lyden (Weill Cornell Medical College), tomamos conhecimento de que a hipótese atual é de que dentre as proteínas secretadas pelo tumor primário, aquelas secretadas em vesículas parecem ser as de maior relevância no contexto de formação dos sítios pré-metastáticos (vide Anexo 2).

Buscamos então avaliar a presença de STI1 secretada em vesículas. Para tal, medimos a quantidade de STI1 em meio condicionado de B16F1 e B16F10 antes e após centrifugação de 100.000xg (precipitação de vesículas). Observamos que na linhagem mais metastática (B16F10), diferentemente de B16F1, a maior parte do STI1 secretada (~60%) encontra-se de fato em vesículas (Figura 20).



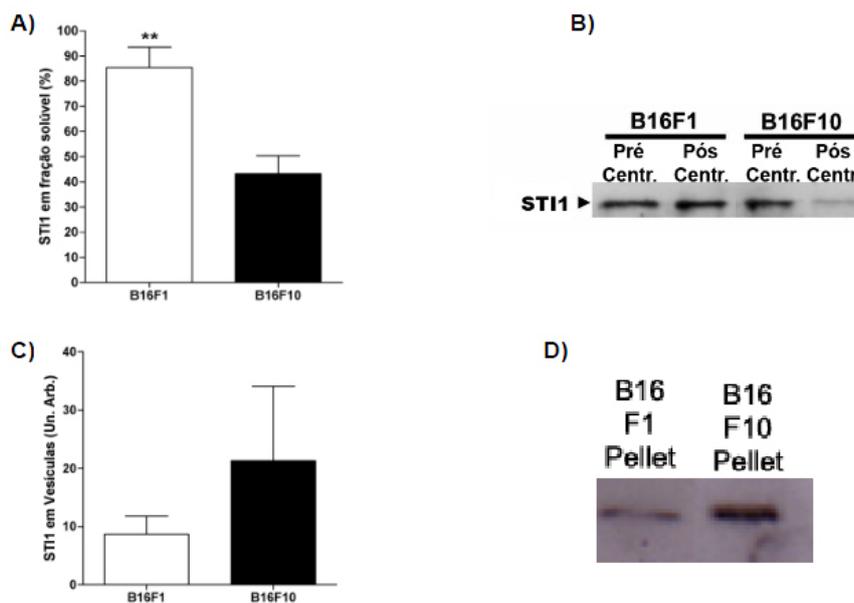
Legenda: Imagem representativa da secreção total de proteínas nas linhagens B16F1 e B16F10 por coloração de prata (A). Representação em unidades arbitrárias da secreção de STI1/HOP corrigida pelo número de células ao término do período de carenciamento em relação à linhagem B16F1 (B e C) ou WiDr (D). Dados representam as médias de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Valores mostrados como média \pm erro padrão.

Figura 18 - Análise do perfil de secreção de proteínas em linhagens de melanomas, de cólon e de pâncreas.



Legenda: Após carenciamento por 48 horas, células B16F1 (A) e B16F10 (B) foram mantidas durante 24 horas em meio sem soro (Controle) acrescido de ST11 ou anticorpo anti-ST11₂₃₀₋₂₄₅ (a-pep ST11). Após este período células positivas para BrdU foram quantificadas. Valores mostrados como média \pm erro padrão.

Figura 19 - Efeito de ST11 e anticorpo anti-ST11₂₃₀₋₂₄₅ na proliferação das linhagens de melanoma murino B16F1 e B16F10.



Legenda: Representação em unidades arbitrárias da presença de ST11 em fração solúvel (A) e vesículas (C). Imagens representativas da presença de ST11 em fração solúvel (B) e vesículas (D) pelo método de Western-Blot. Dados representam as médias de 3 experimentos independentes. $**p < 0,01$. Valores mostrados como média \pm erro padrão.

Figura 20 - Análise quantitativa da presença de ST11 em vesículas e fração solúvel de meios condicionados de B16F1 e B16F10.

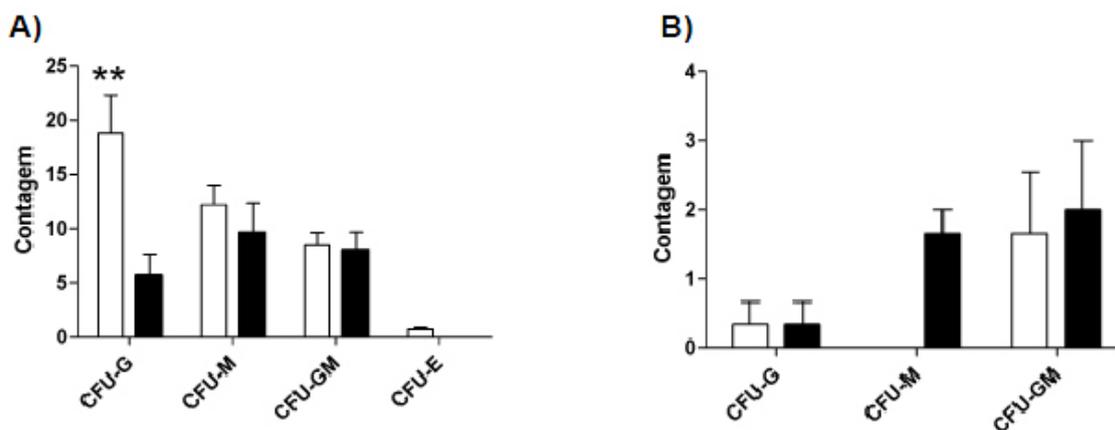
A importância das vesículas e das proteínas nelas contidas no recrutamento de precursores da medula óssea foi abordada em experimentos onde os camundongos foram inoculados durante 1 mês com vesículas isoladas do meio condicionado de células B16F10. Após este período estes animais tiveram suas células tanto do sangue periférico quanto de medula coletadas e analisadas por ensaio de culturas de unidades formadoras de colônias de progenitores hematopoiéticos. Este experimento sugeriu que vesículas secretadas por esta célula tumoral parecem ser suficientes para o recrutamento de progenitores da medula, particularmente precursores de macrófagos, da medula óssea para o sangue periférico (Figura 21).

A análise da expressão de PrP^C nas células de medula óssea de camundongos por citometria de fluxo mostra que PrP^C é expresso em pelo menos parte destas células (Figura 22A).

Uma hipótese interessante seria de que células positivas para a expressão de PrP^C (PrP^{C+}) na medula óssea pudessem ser recrutadas para sítios pré-metastáticos pela ação de STI1 secretada pelos tumores de B16F10.

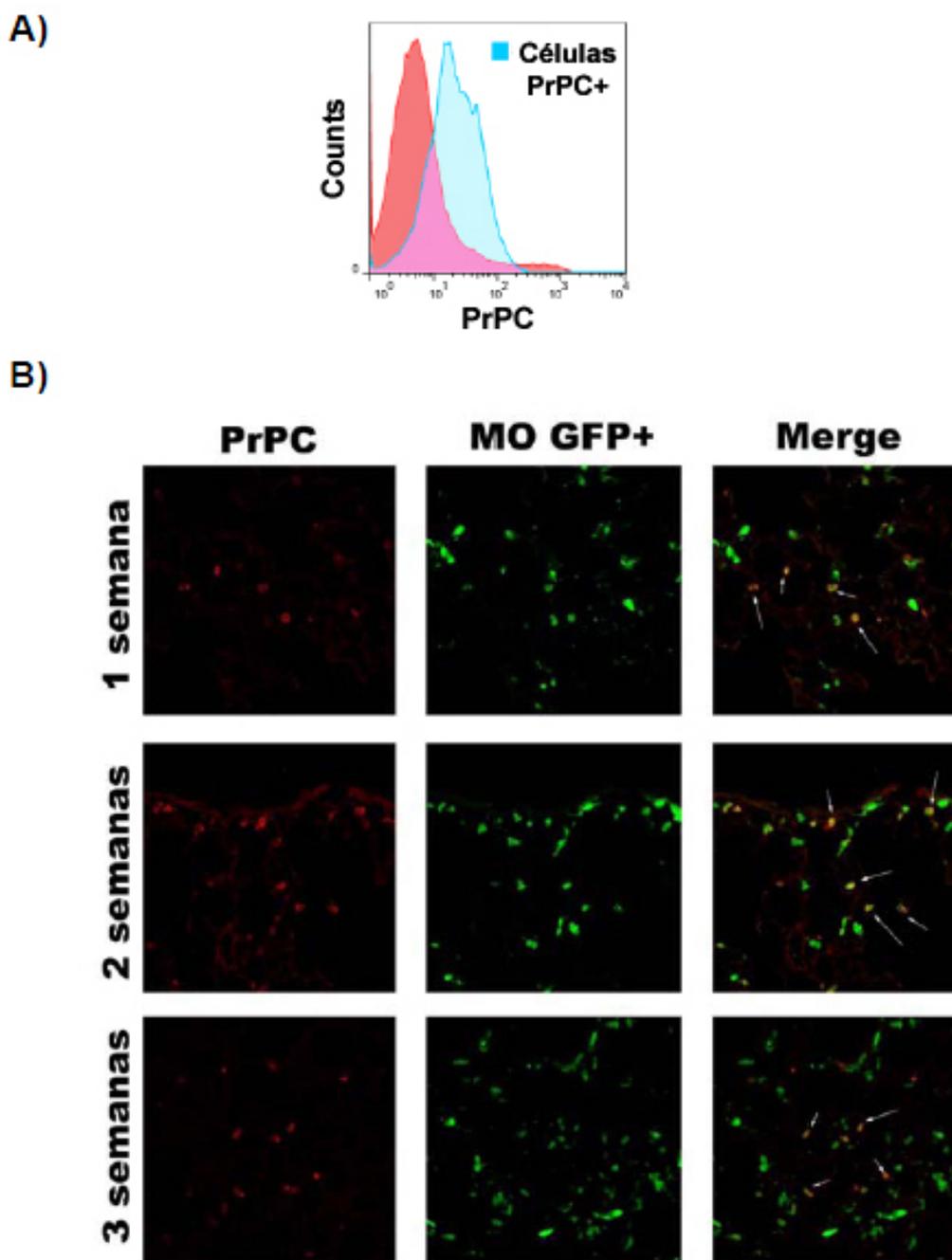
Para abordar esta hipótese camundongos C57Bl/6 foram irradiados e receberam transplante de medula óssea proveniente de animais GFP o que torna possível a visualização de células precursoras da medula para sítios pré-metastáticos. Após 1, 2 e 3 semanas do implante de tumores de células B16F10 o recrutamento para os pulmões de células da medula GFP-positivas e a expressão de PrP^C nestas células determinada por

imunofluorescência. Os resultados apontam que pelo menos parte das células provenientes da medula que contribuem para a formação do sítio pré-metastático eram de fato PrP^{C+} (Figura 22B).



Legenda: Após serem tratados durante 1 mês com 3 inoculações semanais de vesículas de B16F10 ou PBS animais tiveram medula óssea e sangue periférico recolhidos e cultivados por 14 dias em meio de crescimento de unidades formadoras de colônia. Após este período, estas culturas foram quantificadas para a presença de unidades formadoras de colônia de Granulócitos (CFU-G), Macrófagos (CFU-M), Granulócitos e Macrófagos (CFU-GM) ou Eritrócitos (CFU-E). (A) Culturas de células provenientes de lavado de medula, (B) Culturas de sangue periférico. Barras brancas representam grupo controle e barras pretas representam grupo tratado com vesículas de B16F10. Dados representam as médias de 9 experimentos independentes. ** $p < 0,01$. Valores mostrados como média \pm erro padrão.

Figura 21 - Análise de unidades formadoras de colônias em medula óssea e sangue periférico de animais inoculados com vesículas de B16F10.

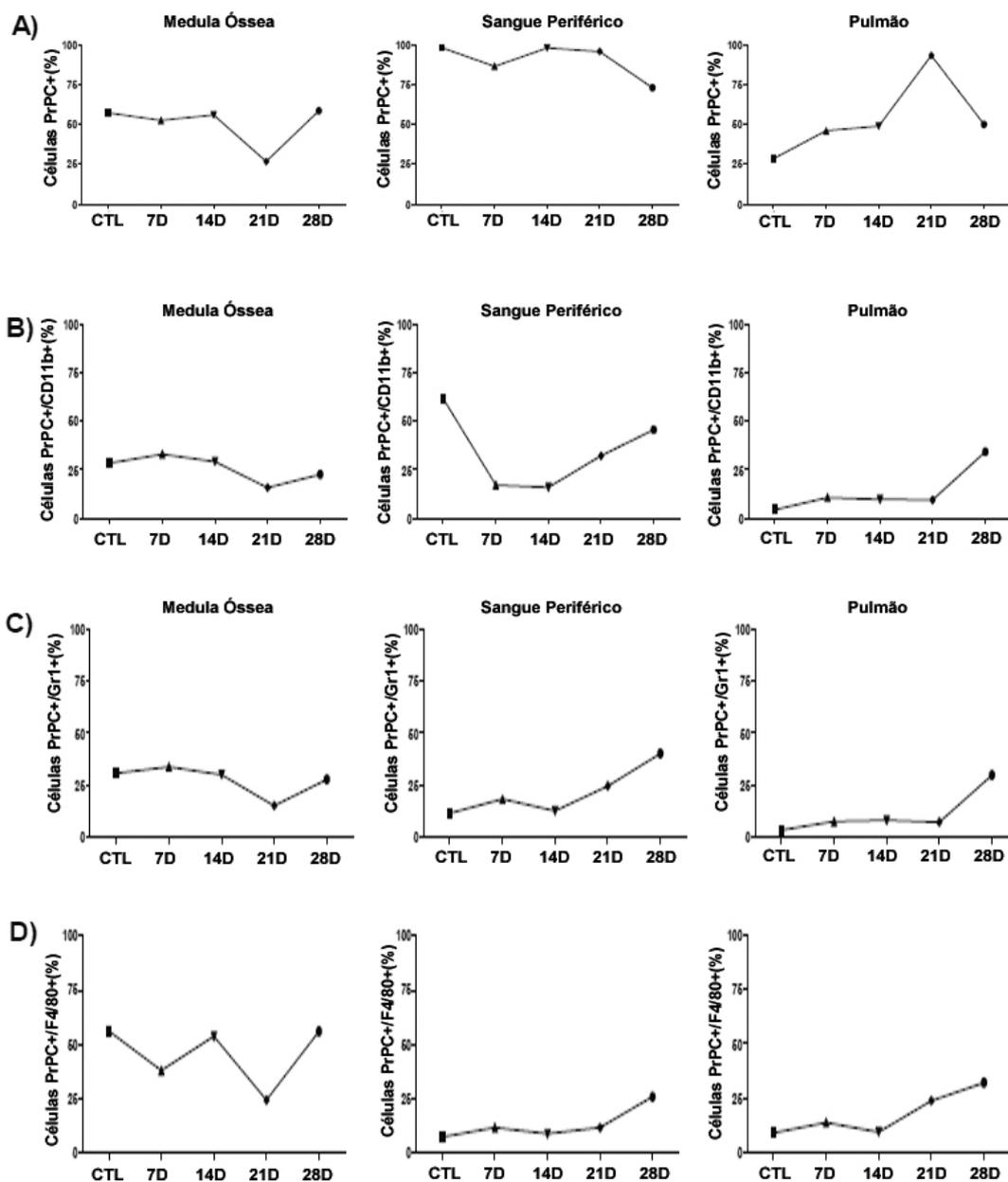


Legenda: (A) Citometria de fluxo em células de medula óssea marcadas para PrP^C; curva azul (anti-PrP^C) curva vermelha (IgG controle), (B) Imagens representativas da expressão de PrP^C (vermelho) em células provenientes da medula óssea (GFP) em pulmão pré-metastático de camundongos com implantes de células de melanoma B16F10. Setas indicam células GFP positivas que expressam PrP^C.

Figura 22 - Análise da expressão de PrP^C em células da medula óssea e em pulmão pré-metastático.

Buscando aprofundar ainda mais estes achados, avaliamos a dinâmica destas células em pulmões, sangue periférico e medula óssea ao longo do crescimento tumoral. Observamos que, já nas primeiras semanas, células PrP^{C+} apresentam número crescente nos pulmões, atingindo um pico na fase de micrometástase (21 dias – Figura 23A). Apesar de não observarmos grandes variações no sangue periférico ao longo da análise, detectamos uma depleção desta população na medula óssea exatamente no período aonde houve uma chegada mais marcante destas células nos pulmões (Figura 23A).

Constatamos ainda que dentre as células PrP^{C+} que chegam aos pulmões, ao menos uma parcela são fagócitos (CD11b – Figura 23B), granulócitos (Gr1 – Figura 23C) e macrófagos (F4/80 – Figura 23D). Reforçando a hipótese de trânsito de células PrP^{C+} da medula óssea para os pulmões, observamos níveis crescentes destes fenótipos no sangue periférico entre os dias 14 e 28, seguido de aumento nos pulmões entre os dias 21 e 28. Ao constatararmos que células PrP^{C+} iniciam a migração da medula óssea para os pulmões antes mesmo da chegada das células metastáticas, que só chegam aos pulmões a partir de 21 dias após seu implante subcutâneo, sugerimos que células PrP^{C+} possam estar contribuindo tanto para a chegada (sítios pré-metastáticos) quanto para o desenvolvimento de metástases tumorais.

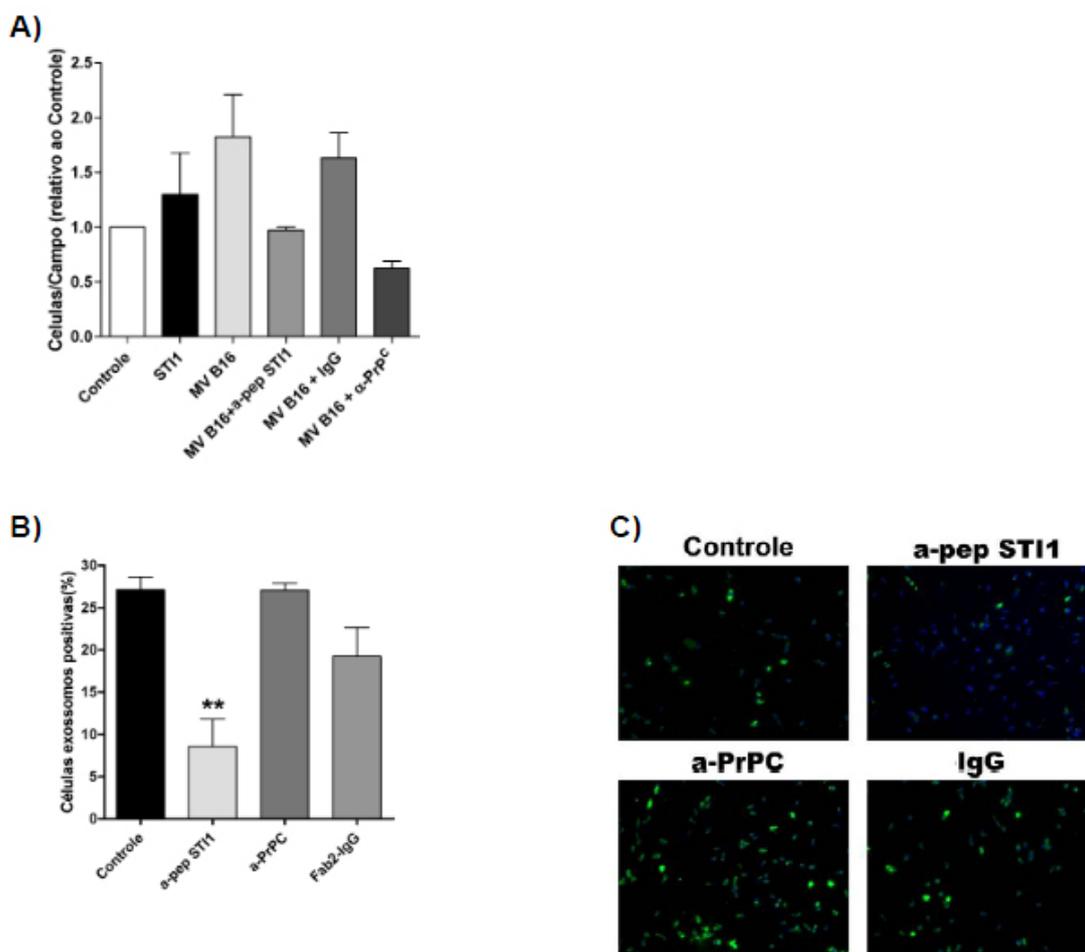


Legenda: Gráficos representam o percentual de leucócitos (eixo y) da medula óssea, sangue periférico e de pulmões marcados para PrP^C (A), PrP^C e CD11b (fagócitos) (B), PrP^C e Gr1 (granulócitos) (C) ou PrP^C e F4/80 (macrófagos) (D) em animais sem tumor (CTL) ou ao longo de 28 dias de crescimento dos tumores B16F10 (eixo x). Pontos representam o percentual de células imunomarcadas em relação ao total de leucócitos encontrados no tecido. Cada ponto da cinética de crescimento tumoral foi determinado a partir análise de amostras provenientes de grupos de 3 animais.

Figura 23 - Análise de populações PrP^{C+} na medula óssea, sangue periférico e pulmões normais, pré e pós metastáticos.

Uma das hipóteses que propomos é de que STI1 secretada pelas células tumorais é capaz de recrutar células PrP^{C+} da medula óssea para o sítio pré-metastático. Na tentativa de dar suporte a esta proposta conduzimos experimentos de migração de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*. O tratamento destas células com vesículas isoladas a partir de meio condicionado de células B16F10 ou com STI1 recombinante leva a um aumento na sua migração. Interessantemente, o tratamento com anticorpos anti-pep-STI1 ou anti-PrP^C leva a uma inibição na migração celular estimulada por vesículas isoladas de B16F10. Já o uso de uma imunoglobulina controle não altera este processo. Estes dados apontam para a importância da interação STI1/PrP^C no processo de migração de linhagens celulares de macrófagos. (Figura 24 A).

Buscando investigar mais detalhadamente a especificidade deste efeito, analisamos ainda a importância das proteínas STI1 e PrP^C presentes nas vesículas de B16F10 na ligação destas partículas a macrófagos RAW 264.7. Observamos que a pré-incubação de vesículas de B16F10 com anti-pep-STI1 foi capaz de diminuir a ligação destas partículas a células RAW. Entretanto tal resultado não foi observado quando vesículas foram pré-incubadas com IgG irrelevante ou com anti-PrP^C (Figura 24 B e C). Isto indica que STI1 presente nas vesículas participada na ligação destas às células Raw. Além disso, em associação com os dados da Figura 24 A estes dados apontam que o efeito de anti-PrP^C observado sobre a migração de células RAW deva se dar pela inibição de PrP^C nestas células.



Legenda: Células RAW264.7 foram plaqueadas em câmara de boyden e sua migração na presença de ST11 recombinante ou de vesículas isoladas a partir de células B16F10 foi avaliada. IgG purificadas anti-peptídeo de ST11₂₃₀₋₂₄₅ (a-pep-ST11), anti-PrP^C ou IgG controle foram ainda combinadas à vesículas de células B16F10. (A) Representação da migração celular em relação ao grupo controle. (B) percentual de células positivas para a incorporação de vesículas de B16F10, (C) imagens representativas da incorporação de vesículas de B16F10 (pontos verdes) a macrófagos RAW 264.7 (pontos azuis). Dados representam as médias de 3 experimentos independentes. **p<0,01. Valores mostrados como média ± erro padrão.

Figura 24 - Medida dos efeitos da interação ST11/PrP^C na ligação e efeitos pró-migratórios de vesículas de B16F10 sobre macrófagos RAW 264.7.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho confirmamos a já descrita expressão de STI1/HOP em linhagens de CC e CP (WALSH et al. 2009; KUBOTA et al. 2010). Demonstramos ainda, de forma inédita, que STI1/HOP é secretada por linhagens celulares de CC, CP e melanomas, podendo atuar como um fator solúvel. Os níveis de expressão tanto de HOP quanto de PrP^C variam entre as linhagens estudadas, sendo que a quantidade de HOP secretada é diretamente proporcional aos seus níveis de expressão. Levando em conta estes achados, e os dados da literatura que sugerem que as concentrações de HOP no sangue periférico possam ser usadas como marcador de malignidade em tumores de ovário (WANG et al. 2010), acreditamos que a quantificação da secreção de HOP no soro de pacientes possa representar uma potencial ferramenta para a detecção e intervenção mais precoces de outros tipos tumorais.

Nossos dados com linhagens de CC *in vitro* apontam que as respostas proliferativas a tratamentos com STI1 mostraram-se proporcionais à expressão de PrP^C (Figura 11 A e B). O uso de inibidores da interação PrP^C-HOP como anticorpos anti-pep-STI1 ou anti- PrP^C (Figura 12C e D) e dos peptídeos HOP₂₃₀₋₂₄₅ e PrP^C₁₁₃₋₁₃₂ (Figura 12A e B) foi capaz de inibir esta resposta. Isto indica, portanto, que nestas células PrP^C medeia o sinal proliferativo oriundo de HOP. Além disso, os efeitos anti-proliferativos observados com estes 4 inibidores apontam que estes poderiam ser

candidatos potenciais em futuros ensaios pré-clínicos de inibição de crescimento *in vivo* deste tumor.

Levando em conta o trabalho de MCEWAN et al. (2009), que descreve efeitos anti-proliferativos de anticorpos anti-PrP^C em CC, acreditamos que ao menos parte dos efeitos descritos neste estudo (especialmente aqueles observados pelo bloqueio da região 132-152 de PrP^C), possam ser decorrentes da interferência indireta sobre a ligação de STI1/HOP à região 113-128 de PrP^C (MARTINS et al. 1997; ZANATA et al. 2002). Entretanto, este grupo apontou ainda que anticorpos dirigidos às regiões 141-151 e 139-142 de PrP^C também foram efetivos na inibição da proliferação de CC (MCEWAN et al. 2009). Isso poderia sugerir que a ligação de moléculas de anticorpo em regiões de PrP^C próximas ao sítio de interação de HOP poderia levar a um impedimento estérico para a ligação de HOP ou de outras proteínas que não STI1/HOP, tais como Receptor de Laminina (GAUCZYNSKI et al. 2001; HUNDT et al. 2001) e NCAM (SANTUCCIONE et al. 2005), que se ligam respectivamente as regiões 143-178 e 143-153 de PrP^C, possam também contribuir para o efeito proliferativo mediado por PrP^C nestes tumores. Com relação ao nosso estudo, devemos levar em conta ainda que o anticorpo anti-PrP^C utilizado em nossos experimentos é policlonal, o que permite sugerir que ao menos parte dos seus efeitos anti-proliferativos na linhagem de CC WiDr (Figura 12D) possam ser decorrentes não apenas da inibição do sítio 113-128 de PrP^C onde se liga HOP mas também de outros domínios de PrP^C.

Por outro lado, a ausência de efeito proliferativo da molécula de STI1 recombinante deletado da região 230-245 (Figura 12B) e o efeito anti-proliferativo do anticorpo anti o peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ (Figura 12A), sítio de interação desta molécula com PrP^C, sobre linhagens de CC sugerem fortemente que o complexo HOP-PrP^C esteja envolvido com a proliferação nas linhagens de CC. Além disso, o fato do peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅, que compete pela interação PrP^C-STI1 (ZANATA et al. 2002) ser capaz de inibir a proliferação mediada por STI1 recombinante nestas células, reforça esta hipótese. Entretanto, devemos levar em conta que o bloqueio deste sítio de HOP pelo anticorpo anti-pep-STI1 possa também interferir na ação de STI1/HOP através de vias de sinalização independentes de PrP^C, como já sugerido anteriormente (ARRUDA-CARVALHO et al. 2007; ARANTES et al. 2009).

Os resultados obtidos com linhagens de CC nos motivaram a avaliar a expressão destas proteínas e sua correlação, particularmente com a proliferação, em amostras de CC humanas. Nossos resultados apontam que, diferentemente dos dados *in vitro*, a expressão de HOP e de PrP^C não está relacionada ao grau de proliferação destes tumores (Figura 14A). Admitindo-se que a secreção de HOP é necessária para que esta se ligue a PrP^C e desencadeie proliferação, podemos supor que os níveis de expressão de HOP em amostras de tumores, diferentemente do observado *in vitro*, não seja um indicador quantitativo da secreção desta proteína. Considerando esta hipótese sugerimos que a quantificação de HOP no soro

de pacientes possa ser um melhor indicador da secreção desta proteína pelo tumor primário e de sua atividade sobre a proliferação dos CC.

Como discutido acima, o modelo *in vitro* usando linhagens de CC aponta para a participação de PrP^C no processo de proliferação. Por outro lado, esta correlação não foi encontrada nos tecidos humanos de CC. Neste caso, devemos considerar a hipótese de que as medidas de PrP^C em amostras de micro arranjo destes tecidos possam não ser indicadores diretos da presença desta proteína na superfície celular. A observação cuidadosa das imunohistoquímicas mostra que existe marcação para PrP^C tanto na membrana como no citoplasma e qualquer modificação que retenha PrP^C no citoplasma pode interferir com o modelo de proliferação proposto neste trabalho.

Nas linhagens tumorais de pâncreas estudadas, diferentemente da de CC descritas anteriormente, a expressão de PrP^C e HOP parece não estar relacionada (Figuras 8 e 9D). Além disso, nas células CP MIA PaCa-2, aonde STI1 recombinante foi capaz de induzir proliferação celular, inibidores da interação PrP^C-STI1/HOP pareceram incapazes de reverter este efeito (Figura 13), sugerindo que os efeitos de STI1/HOP seriam independentes de PrP^C.

Interessantemente, assim como observado em CC a expressão de PrP^C e HOP em amostras de CP mostram uma correlação positiva (Figura 15D). Entretanto, o significado biológico deste achado ainda não está esclarecido uma vez que pelo menos a expressão de PrP^C não foi

correlacionada com proliferação nestes tumores, que era nossa hipótese inicial.

A ausência de correlação entre a expressão de PrP^C e a proliferação em CP pode ser explicada, como já colocado anteriormente para CC, por limitações na detecção de PrP^C na superfície celular no tecido tumoral. Entretanto, cabe mencionar o recente trabalho de LI C et al. (2009), aonde foi demonstrado que em CP PrP^C é expresso em níveis elevados na forma de pro-PrP^C. Neste pro-PrP^C o peptídeo sinal da extremidade carboxila não é removido para a adição da âncora de GPI e medeia interação de PrP^C a Filamina A (proteína citoplasmática que se associa a filamentos de actina) (FENG e WALSH 2004). A presença desta molécula de PrP^C alterada desencadeia modificações no citoesqueleto que resultam na promoção da proliferação em linhagens de CP (LI C et al. 2009). Entretanto, medidas da expressão de pro-PrP^C em amostras pacientes com CP não apresentaram correlação com o tamanho destes tumores (LI et al. 2009), sugerindo, assim como em nossos experimentos, que PrP^C possa não apresentar papel no crescimento de CP.

Um conjunto de resultados intrigantes diz respeito à linhagem de CP AsPc-1, aonde apesar da pronunciada expressão e secreção de HOP (Figuras 9D e 10B), observamos uma baixa proliferação basal (em torno de 1,5%) e ausência de resposta a tratamentos com STI1 recombinante (Figura 11C). Apesar de contradizer achados obtidos em MIA PaCa-2 e em microarranjos de tecidos, não podemos descartar completamente que este efeito possa ser decorrente da baixa expressão de PrP^C nesta linhagem

(Figura 8B). Este resultado pode ainda remeter a um cenário já ilustrado pelo nosso grupo em modelo de células gliais de camundongos (ARANTES et al. 2009), no qual STI1 pode atuar independentemente de PrP^C como inibidor da proliferação celular. Entretanto, considerando mais uma vez dados de microarranjos de tecidos de CP, aonde observamos correlação entre a expressão de HOP e a proliferação destes tumores (Figura 15A), podemos considerar que os achados na linhagem AsPc-1 representam uma exceção ao observado de maneira geral em CP.

Outra possibilidade interessante é de que em casos como o da linhagem AsPc-1, aonde haja elevada secreção de STI1/HOP, esta proteína desencadeie algum processo que não o de proliferação celular. Ao considerarmos que das linhagens estudadas apenas AsPc-1 foi estabelecida a partir de uma ascite de um paciente com adenocarcinoma de pâncreas (CHEN et al. 1982), apresentando grande capacidade metastática (TAN e CHU 1985), e trabalhos sugerindo que HOP apresenta papel no processo de invasão de tumores de pâncreas (WALSH et al. 2009), consideramos bastante relevante a avaliação do potencial papel da secreção de HOP por tumores primários no desenvolvimento de metástases.

Reforçando ainda mais esta hipótese, pudemos observar que a secreção de HOP é maior nas linhagens de pâncreas que nas de cólon (Figura 18D). Este dado ganha especial importância quando consideramos que, de maneira geral, tumores pancreáticos geram metástases com maior frequência que tumores de cólon (STEEG 2006). Além disso, estudos

envolvendo algumas das linhagens de pâncreas utilizadas em nosso estudo (tais como AsPc-1, BxPc-3, MIA PaCa-2 e PANC-1) demonstram que AsPc-1 (a com maior expressão e secreção de HOP) (Figuras 9D e 10B) é exatamente a linhagem com maior potencial metastático (SUEMIZU et al. 2007). Portanto, estas observações nos motivaram a investigar mais profundamente o possível papel de STI1/HOP e PrP^C no processo de metástase tumoral.

Para tal, iniciamos uma colaboração com o grupo do Dr. David Lyden, na Weill Cornell Medical College – EUA, conhecido não apenas pelo estudo de proteínas e processos celulares envolvidos na formação de metástase, mas principalmente por introduzir o conceito de sítio pré-metastático. Tal conceito propõe que fatores secretados por tumores primários atuam sistemicamente de forma a tornar futuros sítios metastáticos mais receptivos à colonização e crescimento de células provenientes do sítio tumoral primário (KAPLAN et al. 2005; PSAILA e LYDEN 2009).

Buscando um modelo *in vivo* aonde a implantação de tumores que promovam metástases espontâneas fosse de simples execução e bem caracterizado, escolhemos o modelo de melanomas murinos B16F1 e B16F10. Neste contexto é de grande relevância o trabalho de CARTA et al. (2005), aonde foi sugerido que a desregulação de níveis de proteínas de estresse (tais como Hsp27, Hsp60, HspA8) em linhagens de melanomas humanos pode estar relacionada a formação de metástases.

Ao avaliarmos a expressão de STI1 e PrP^C nas linhagens de melanoma murino de alto (B16F10) e baixo potencial metastático (B16F1)

(SUEMIZU et al. 2007; HAMADA et al. 2008), constatamos que ambas proteínas são expressas de forma semelhante nestes tumores. Entretanto, ao determinarmos o perfil de secreção de proteínas nestas células, constatamos que de maneira geral B16F10 secreta maior quantidade e variedade de proteínas do que B16F1 (Figura 18A). Como provável consequência, observamos que tanto PrP^C quanto STI1 eram secretadas em maiores concentrações na linhagem mais metastática B16F10 (Figura 18B e C). Interessantemente, concordando com a idéia de que STI1/HOP é altamente secretada em linhagens metastáticas, observamos que os níveis de secreção desta proteína em melanomas são comparáveis aos observados em linhagens de CP, sendo estes últimos maiores que aqueles de CC (Figura 18D).

Considerando que dentre as proteínas secretadas por tumores, aquelas secretadas em vesículas apresentam especial relevância no recrutamento de células da medula óssea para o sangue periférico (Figura 21) e então para sítios pré-metastáticos (vide Anexo 2), e experimentos aonde observamos que em astrócitos corticais de camundongo uma das formas principais de secreção de STI1 é via vesículas (vide anexo 4), consideramos importante investigar se o mesmo ocorria em linhagens de melanoma murino. De fato, observamos não apenas que STI1 é secretada em vesículas em uma proporção relevante nestas linhagens, mas também que a secreção desta proteína por este mecanismo ocorre predominantemente na linhagem mais metastática (B16F10), e não na menos metastática (B16F1) (Figura 20). Este achado sugere que STI1 pode,

participar dos efeitos causados pelas vesículas de B16F10 no recrutamento de células da medula óssea.

Tendo em mente resultados não publicados aonde demonstramos que Rab27a, uma proteína que possui papel importante no processo de formação e liberação de exossomos (OSTROWSKI et al. 2010), participa de forma marcante na liberação de vesículas em linhagens de melanomas humanos e murinos, especulamos que níveis diferentes de expressão desta proteína em B16F1 e B16F10 possam contribuir para as diferenças de secreção observadas entre estas linhagens. Este resultado forneceria uma nova perspectiva acerca de trabalhos que descartam o papel de STI1/HOP em processos de metástases de melanomas humanos pelo fato desta proteína apresentar expressão estável tanto em quadros metastáticos quanto não metastáticos (CARTA et al. 2005). Desta forma, consideramos que em futuros estudos a avaliação conjunta não apenas da expressão total de proteínas candidatas (Tais como STI1/HOP, Hsp27 e Hsp60), mas também do seu perfil de secreção pelas células estudadas a partir, por exemplo, da medição combinada dos níveis de proteínas Rab, como já demonstrado em tumores de mama (HENDRIX et al. 2010), será de grande importância no estudo de casos de metástases tumorais.

Com estes resultados em mãos, de forma a testar em um terceiro modelo a hipótese de que para a promoção de proliferação por STI1/HOP células necessitam de níveis mínimos de expressão de PrP^C em suas membranas, avaliamos a resposta das linhagens B16F1 e B16F10 aos tratamentos tanto com STI1 recombinante quanto com anticorpo anti-pep-

STI1 (Figura 19). Como esperado, provavelmente por apresentarem baixos níveis de PrP^C em suas membranas, estas células não modificaram sua proliferação celular em resposta a tratamentos com STI1 recombinante. Além disso, tratamentos com anticorpo anti-pep-STI1 não foram capazes de influenciar a proliferação desta célula, o que descarta a hipótese de que os níveis de STI1 secretados pelas células estivessem em concentrações saturadas quanto à ligação a PrP^C, caso em que a adição de STI1 recombinante não seria capaz de aumentar ainda mais a proliferação destas células.

Tendo em mente dados que sugerem que PrP^C é expresso na forma de pro-PrP^C em linhagens humanas de melanoma, e que esta proteína participa dos processos de migração e invasão destes tumores (SY et al. 2010), sugerimos que a ausência de efeito de STI1 sobre a proliferação destas células possa ser decorrente de anomalias referentes às moléculas de PrP^C expressas por estas linhagens. Tal dado sugere ainda, da mesma forma do proposto na linhagem de tumor pancreático AsPc-1, que STI1/HOP secretada por estas células possa atuar em outros processos que não o de proliferação do tumor primário, como por exemplo na formação do sítio pré-metastático com o recrutamento de células precursoras da medula óssea.

Neste contexto, um componente importante para a ação de STI1 secretada por B16F10 sobre estas células da medula óssea é a sua expressão de receptores de STI1, como PrP^C. Resultados da literatura demonstram que PrP^C é expresso, dentre outras células, por progenitores hematopoiéticos da medula óssea (LIU et al. 2001), granulócitos (DODELET

e CASHMAN 1998) e macrófagos (DE ALMEIDA et al. 2005; KREBS et al. 2006). Dada a importância destas populações no contexto tumoral (HUSSEIN 2006), buscamos avaliar a sua dinâmica ao longo do desenvolvimento de melanomas murinos.

A partir de experimentos envolvendo animais transplantados com medula proveniente de doadores GFP⁺ observamos que células PrP^{C+} migram da medula para pulmões pré-metastáticos a partir de sinais provenientes de tumores primários (Figura 22). Buscando aprofundar ainda mais estes achados, avaliamos a dinâmica destas células em pulmões, sangue periférico e medula óssea ao longo do crescimento tumoral. Observamos já nas primeiras semanas níveis crescentes de células PrP^{C+} nos pulmões, atingindo um pico na fase de micrometástase (21 dias – Figura 23A). Apesar de não observarmos grandes variações no sangue periférico ao longo da análise, detectamos uma depleção desta população na medula óssea exatamente no período em que houve um maior aporte destas células nos pulmões (Figura 23A).

Em conjunto, estes achados reforçam a hipótese de que em decorrência do crescimento do tumor primário, células PrP^{C+} estejam migrando da medula óssea para os pulmões. Além disso, a chegada marcante de células PrP^{C+} nos pulmões no 21º dia de análise aponta para um potencial papel destas células não apenas na origem, mas também no estabelecimento e crescimento de focos metastáticos.

Ainda em relação à dinâmica desta população, pode-se sugerir que parte da diminuição observada nos pulmões no 28º dia deva-se à chegada

de leucócitos PrP^{C-} e/ou ainda à perda da expressão de PrP^C em decorrência, por exemplo, da diferenciação desta população nos pulmões. Além disto, tendo em vista a restauração dos níveis de células PrP^{C+} na medula óssea entre os dias 21 e 28, pode-se considerar ao menos em parte que tal processo deva-se a uma diminuição do aporte proveniente da medula óssea.

Entretanto, considerando a relativa estabilidade dos fenótipos aqui estudados na medula óssea e o aumento marcante destas populações exatamente após a chegada pronunciada de células PrP^{C+} nos pulmões (21º dia - Figura 23A), devemos considerar que ao menos parte da dinâmica observada deve-se ao processo de diferenciação de progenitores/precursos hematopoiéticos PrP^{C+} nos fenótipos estudados. De fato, estudos sugerem que a expressão de PrP^C em leucócitos tende a diminuir ao longo da diferenciação destas células (DODELET e CASHMAN 1998; POLITOPOULOU et al. 2000; LIU et al. 2001).

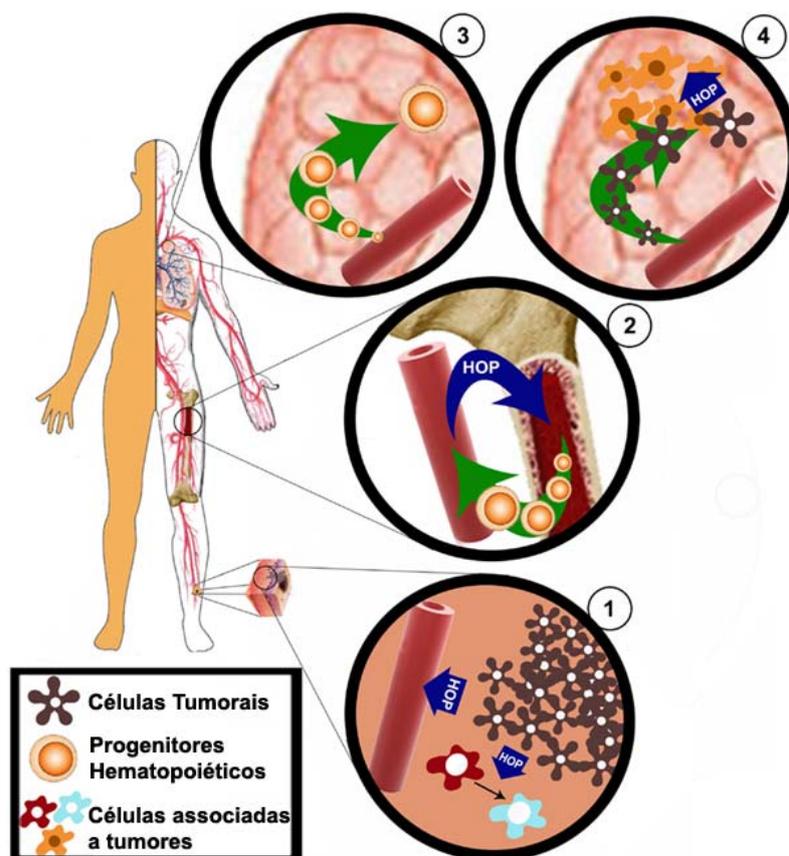
Dada a relevância da ação de macrófagos no remodelamento do microambiente tumoral (SIVEEN e KUTTAN 2009; MANTOVANI e SICA 2010), partimos para a análise *in vitro* do eventual papel da STI1 presente nas vesículas secretadas por B16F10 não apenas no perfil migratório de macrófagos, mas também do possível papel desta proteína na ligação de vesículas a leucócitos. Observamos que STI1/HOP presente na superfície de vesículas de B16F10 participa na ligação destas partículas a receptores tais como PrP^C presentes em macrófagos (Figura 24B e C). Observamos ainda que esta ligação é capaz de contribuir para a promoção dos efeitos

pró-migratórios provenientes de vesículas liberadas por melanomas B16F10. Vimos também que STI1 recombinante é capaz de mimetizar, ao menos parcialmente, os efeitos migratórios de vesículas de B16F10 (Figura 24A).

Neste contexto, é interessante ressaltar os estudos que descrevem potenciais papéis de PrP^C como modulador negativo da fagocitose em macrófagos (DE ALMEIDA et al. 2005). Apesar da necessidade de estudos mais aprofundados, podemos sugerir que nesse cenário STI1 seja secretada por tumores primários, ligue-se a PrP^C de macrófagos promovendo a sua migração para sítios tumorais ou pré-metastáticos, contribuindo em um segundo momento para a polarização de macrófagos em um fenótipo imune-supressivo, como o observado em macrófagos M2 (ROLNY et al. 2011), podendo ainda desencadear a secreção de fatores solúveis (tais como VEGF) que atuem de forma a contribuir para o enriquecimento vascular e crescimento dos focos tumorais.

Assim, ao observarmos a elevada secreção de STI1/HOP em linhagens com conhecido potencial metastático, a expressão de PrP^C em células da medula óssea que participam da formação de sítios pré-metastáticos e a participação da interação PrP^C-STI1 na migração de macrófagos, acreditamos que o complexo PrP^C-STI1 pode ser relevante no contexto tanto de formação tanto de metástases quanto do microambiente tumoral (Figura 25). Acreditamos também que, dado ao número escasso de marcadores que podem prever a agressividade e evolução metastática dos melanomas (HOEK et al. 2006), a medida de níveis de HOP na

circulação periférica possa representar uma ferramenta interessante no diagnóstico e potencial intervenção terapêutica deste tipo tumoral. Estudos do grupo já estão em andamento na tentativa de avaliar as possíveis correlações entre os níveis séricos de HOP e o estadiamento de pacientes com melanoma.



Legenda: Proposta da ação de STI1/HOP secretada por tumores primários atuando sobre células associadas a tumores e/ou sendo liberada para a circulação periférica (1), de onde atuaria sobre células PrP^{C+} da medula óssea, promovendo o recrutamento destas para o sangue periférico (2) e então para sítios pré-metastáticos (3). A presença destas células nos sítios pré-metastáticos contribuiria para a chegada e estabelecimento de células tumorais contribuindo assim para o processo de metástase tumoral.

Figura 25 – Proposta do papel de STI1/HOP secretado por tumores sobre o recrutamento de progenitores hematopoiéticos para sítios pré-metastáticos.

6 CONCLUSÕES

- I- Linhagens celulares de tumor de cólon e pâncreas apresentam expressão de PrP^C e HOP e a secreção de HOP é diretamente proporcional à expressão desta proteína;
- II- HOP apresenta papel na proliferação da linhagem de tumor de cólon WiDr através de um mecanismo dependente de PrP^C;
- III- A expressão de HOP e PrP^C em amostras de adenocarcinoma de cólon parece não estar relacionada à proliferação destes tumores;
- IV- HOP induz a proliferação em linhagens celulares de tumores de pâncreas independentemente de PrP^C;
- V- A expressão de HOP em amostras de tumores de pâncreas está relacionada com sua proliferação;
- VI- A secreção de STI1/HOP é mais elevada em linhagens celulares com maior potencial metastático;
- VII- PrP^C pode participar na formação de sítios pré-metastáticos uma vez que é expresso em leucócitos provenientes da medula óssea que são recrutados para estes sítios;
- VIII- STI1 presente em vesículas secretadas por células de melanoma liga-se a PrP^C de macrófagos e promove sua migração, o que sugere que esta possa em associação com PrP^C participar na formação de sítios pré-metastáticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akdogan M, Sasmaz N, Kayhan B, Biyikoglu I, Disibeyaz S, Sahin B. Extraordinarily elevated CA19-9 in benign conditions: a case report and review of the literature. **Tumori** 2001; 87:337-9.

Alais S, Simoes S, Baas D, et al. Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. **Biol Cell** 2008; 100:603-15.

[ACS] American Cancer Society. **What are the key statistics about melanoma?** Available from: <URL:<http://www.cancer.org/Cancer/SkinCancer-Melanoma/DetailedGuide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>> [2011a abril 3]

[ACS] American Cancer Society. **What are the key statistics about pancreatic cancer?** Available from: <URL:<http://www.cancer.org/Cancer/PancreaticCancer/DetailedGuide/pancreatic-cancer-key-statistics>>. [2011b abril 3]

Amselgruber WM, Buttner M, Schlegel T, Schweiger M, Pfaff E. The normal cellular prion protein (PrP_c) is strongly expressed in bovine endocrine pancreas. **Histochem Cell Biol** 2006; 125:441-8.

Anisowicz A, Messineo M, Lee SW, Sager R. An NF-kappa B-like transcription factor mediates IL-1/TNF-alpha induction of gro in human fibroblasts. **J Immunol** 1991; 147:520-7.

Antonacopoulou AG, Grivas PD, Skarlas L, Kalofonos M, Scopa CD, Kalofonos HP. POLR2F, ATP6V0A1 and PRNP expression in colorectal cancer: new molecules with prognostic significance? **Anticancer Res** 2008; 28:1221-7.

Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia** 2009; 57:1439-49.

Arruda-Carvalho M, Njaine B, Silveira MS, Linden R, Chiarini LB. Hop/STI1 modulates retinal proliferation and cell death independent of PrPC. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 361:474-80.

Balaj L, Lessard R, Dai L et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. **Nat Commun** 2011; 2:180.

Balentien E, Mufson BE, Shattuck RL, Derynck R, Richmond A. Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation. **Oncogene** 1991; 6:1115-24.

Bennion BJ, Daggett V. Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. **Clin Chem** 2002; 48:2105-14.

Benson AB, 3rd. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. **J Manag Care Pharm** 2007; 13:S5-18.

Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology (Williston Park)** 2009; 23:488-96.

Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. **J Clin Oncol** 2008; 26:2828-38.

Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. **Biochem J** 1998; 334:423-9.

Bueler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **Int Immunol** 2005; 17:879-87.

Carta F, Demuro PP, Zanini C, et al. Analysis of candidate genes through a proteomics-based approach in primary cell lines from malignant melanomas and their metastases. **Melanoma Res** 2005; 15:235-44.

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. **J Virol** 1989; 63:175-81.

Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. **CA Cancer J Clin** 2009; 59:366-78.

Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:1688-94.

Chen R, Pan S, Cooke K, et al. Comparison of pancreas juice proteins from cancer versus pancreatitis using quantitative proteomic analysis. **Pancreas** 2007; 34:70-9.

Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, et al. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. **In Vitro** 1982; 18:24-34.

Cheung W, Darfler MM, Alvarez H, et al. Application of a global proteomic approach to archival precursor lesions: deleted in malignant brain tumors 1

and tissue transglutaminase 2 are upregulated in pancreatic cancer precursors. **Pancreatology** 2008; 8:608-16.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21:3317-26.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol** 2009; 19:43-51.

Cocucci E, Racchetti G, Rupnik M, Meldolesi J. The regulated exocytosis of enlargosomes is mediated by a SNARE machinery that includes VAMP4. **J Cell Sci** 2008; 121:2983-91.

Coghlin C, Murray GI. Current and emerging concepts in tumour metastasis. **J Pathol** 2010; 222:1-15.

Coitinho AS, Dietrich MO, Hoffmann A, et al. Decreased hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP(C)). **Brain Res Mol Brain Res** 2002; 107:190-4.

Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. **Neuroreport** 2003; 14:1375-9.

Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. **Neurosci Lett** 1996; 209:49-52.

Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. **Brain Res** 1997; 755:28-35.

Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature** 1994; 370:295-7.

Colombo MP, Maccalli C, Mattei S, Melani C, Radrizzani M, Parmiani G. Expression of cytokine genes, including IL-6, in human malignant melanoma cell lines. **Melanoma Res** 1992; 2:181-9.

De Almeida CJ, Chiarini LB, Da Silva JP, Martins MA, Linden R. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. **J Leukoc Biol** 2005; 77:238-46.

Diamandis EP. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. **Mol Cell Proteomics** 2004; 3:367-78.

Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. **Br J Dermatol** 2002; 146 Suppl 61:1-6.

Dodelet VC, Cashman NR. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. **Blood** 1998; 91:1556-61.

Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. **Cancer** 2010; 116:544-73.

Ellis V, Daniels M, Misra R, Brown DR. Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. **Biochemistry** 2002; 41:6891-6.

Erlich RB, Kahn SA, Lima FR et al. ST11 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia** 2007; 55:1690-8.

Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle** 2004; 3:1098-100.

Fazal S, Saif MW. Supportive and palliative care of pancreatic cancer. **JOP** 2007; 8:240-53.

Feng Y, Walsh CA. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. **Nat Cell Biol** 2004; 6:1034-8.

Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS et al. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. **JAMA** 2005; 294:1647-54.

Fevrier B, Vilette D, Archer F, et al. Cells release prions in association with exosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:9683-8.

Ford MJ, Burton LJ, Li H, et al. A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. **Neuroscience** 2002a; 111:533-51.

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. **Neuroscience** 2002b; 113:177-92.

Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette De Villemeur T, et al. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. **Cell Tissue Res** 1998; 292:77-84.

Gandini S, Botteri E, Iodice S, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. **Int J Cancer** 2008; 122:155-64.

Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, et al. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. **EMBO J** 2001; 20:5863-75.

Gloster HM, Jr., Neal K. Skin cancer in skin of color. **J Am Acad Dermatol** 2006; 55:741-60; quiz 61-4.

Gonzalez-Iglesias R, Pajares MA, Ocal C, Espinosa JC, Oesch B, Gasset M. Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. **J Mol Biol** 2002; 319:527-40.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res Mol Brain Res** 2000a; 76:85-92.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett** 2000b; 482:257-60.

Graves DT, Barnhill R, Galanopoulos T, Antoniadis HN. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo. **Am J Pathol** 1992; 140:9-14.

Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, et al. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. **Mol Cell Proteomics** 2006; 5:157-71.

Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. **J Clin Oncol** 2010; 28:264-71.

Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **J Cell Sci** 2007; 120:1915-26.

Hamada K, Monnai M, Kawai K, et al. Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD/Shi-scid IL2R γ manu (NOG) mice. **Int J Oncol** 2008; 32:153-9.

Harris DA. Cellular biology of prion diseases. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12:429-44.

Hart AR, Kennedy H, Harvey I. Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2008; 6:275-82.

Haskill S, Peace A, Morris J, et al. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1990; 87:7732-6.

Hendrix A, Maynard D, Pauwels P, et al. Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. **J Natl Cancer Inst** 2010; 102:866-80.

Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. **Pigment Cell Res** 2006; 19:290-302.

Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M. A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. **J Gen Virol** 1995; 76:2583-7.

Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O, et al. Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. **J Biol Chem** 2005; 280:17062-7.

Hundt C, Peyrin JM, Haik S et al. Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. **EMBO J** 2001; 20:5876-86.

Hussein MR. Tumour-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. **Int J Exp Pathol** 2006; 87:163-76.

Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington De Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. **Br J Cancer** 2005; 92:2076-83.

Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. **Langenbecks Arch Surg** 2008; 393:535-45.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin** 2008; 58:71-96.

Johansen D, Borgstrom A, Lindkvist B, Manjer J. Different markers of alcohol consumption, smoking and body mass index in relation to risk of pancreatic cancer. A prospective cohort study within the Malmo Preventive Project. **Pancreatology** 2009; 9:677-86.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature** 2005 438:820-7.

Katz MH, Hwang R, Fleming JB, Evans DB. Tumor-node-metastasis staging of pancreatic adenocarcinoma. **CA Cancer J Clin** 2008; 58:111-25.

Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. **Immunol Lett** 2006; 107:102-8.

Klein-Scory S, Kubler S, Diehl H, et al. Immunoscreening of the extracellular proteome of colorectal cancer cells. **BMC Cancer** 2010; 10:70.

Koomen JM, Haura EB, Bepler G, et al. Proteomic contributions to personalized cancer care. **Mol Cell Proteomics** 2008; 7:1780-94.

Krebs B, Dorner-Ciossek C, Schmalzbauer R, Vassallo N, Herms J, Kretzschmar HA. Prion protein induced signaling cascades in monocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 340:13-22.

Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. **N Engl J Med** 1991; 324:709-15.

Kubosaki A, Yusa S, Nasu Y, et al. Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 282:103-7.

Kubota H, Yamamoto S, Itoh E, et al. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress Chaperones** 2010; 15:1003-11.

Lambert R, Sauvaget C, Sankaranarayanan R. Mass screening for colorectal cancer is not justified in most developing countries. **Int J Cancer** 2009; 125:253-6.

Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **J Biol Chem** 1997; 272:1876-84.

Lauriti G, Cananzi M, Pierro A, Eaton S, De Coppi P. Intestinal ischemia-reperfusion injury causes activation of bone marrow-derived progenitor cells. **Eur J Pediatr Surg** 2009; 19:366-9.

Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR. Towards cellular receptors for prions. **Rev Med Virol** 2003; 13:399-408.

Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **J Neurochem** 2001; 79:79-87.

Li C, Yu S, Nakamura F et al. Binding of pro-prion to filamin A disrupts cytoskeleton and correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. **J Clin Invest** 2009; 119:2725-36.

Li C, Xin W, Sy MS. Binding of pro-prion to filamin A: by design or an unfortunate blunder. **Oncogene** 2010; 29:5329-45.

Li D, Morris JS, Liu J, et al. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. **JAMA** 2009; 301:2553-62.

Liang J, Pan Y, Zhang D, et al. Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. **FASEB J** 2007; 21:2247-56.

Liang J, Pan YL, Ning XX, et al. Overexpression of PrPC and its antiapoptosis function in gastric cancer. **Tumour Biol** 2006; 27:84-91.

Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem** 2007; 103:2164-76.

Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ, Moreira ME, Barcinski MA. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. **Cancer Lett** 2009; 283:168-75.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev** 2008; 88:673-728.

Liu T, Li R, Wong BS, et al. Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. **J Immunol** 2001; 166:3733-42.

Longshaw VM, Dirr HW, Blatch GL, Lassel M. The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif. **Biol Chem** 2000; 381:1133-8.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005; 25:11330-9.

Lynch PM. Prevention of colorectal cancer in high-risk populations: the increasing role for endoscopy and chemoprevention in FAP and HNPCC. **Digestion** 2007; 76:68-76.

Madore N, Smith KL, Graham CH, et al. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. **EMBO J** 1999; 18:6917-26.

Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development** 1992; 115:117-22.

Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol** 2010; 22:231-7.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

Mcewan JF, Windsor ML, Cullis-Hill SD. Antibodies to prion protein inhibit human colon cancer cell growth. **Tumour Biol** 2009; 30:141-7.

Meggio F, Negro A, Sarno S, et al. Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. **Biochem J** 2000; 352 Pt 1:191-6.

Mellman I, Warren G. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. **Cell** 2000; 100:99-112.

Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, et al. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. **Cell** 2003; 114:497-509.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer I. **Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. **N Engl J Med** 1990; 322:352-8.

Mrowietz U, Schwenk U, Maune S et al. The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice. **Br J Cancer** 1999; 79:1025-31.

Murray GI, Telfer CM, Melvin WT. **Markers for colorectal cancer**. United States Patent Application 20060188883. 2006 Aug 24.

Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. **Int J Dermatol** 2010; 49:978-86.

Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009; 10:148-55.

Nico PB, De-Paris F, Vinade ER, et al. Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein. **Behav Brain Res** 2005; 162:173-81.

Odunuga OO, Longshaw VM, Blatch GL. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **Bioessays** 2004; 26:1058-68.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nat Cell Biol** 2010; 12:19-30; sup pp 1-13.

Pan Y, Zhao L, Liang J, et al. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. **FASEB J** 2006; 20:1886-8.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **Ca Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Paulitschke V, Kunstfeld R, Mohr T, et al. Entering a new era of rational biomarker discovery for early detection of melanoma metastases: secretome analysis of associated stroma cells. **J Proteome Res** 2009; 8:2501-10.

Pavlou MP, Diamandis EP. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? **J Proteomics** 2010; 73:1896-906.

Permeth-Wey J, Egan KM. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. **Fam Cancer** 2009; 8:109-17.

Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. **Blood Rev** 2007; 21:157-71.

Pleskow DK, Berger HJ, Gyves J, Allen E, Mclean A, Podolsky DK. Evaluation of a serologic marker, CA19-9, in the diagnosis of pancreatic cancer. **Ann Intern Med** 1989; 110:704-9.

Politopoulou G, Seebach JD, Schmugge M, Schwarz HP, Aguzzi A. Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes. **Haematologica** 2000; 85:580-7.

Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. **Science** 1991; 252:1515-22.

Prusiner SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:13363-83.

Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:285-93.

Qian WJ, Jacobs JM, Liu T, Camp DG, 2nd, Smith RD. Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. **Mol Cell Proteomics** 2006; 5:1727-44.

Ray S, Chattopadhyay N, Biswas N, Chatterjee A. Regulatory molecules in tumor metastasis. **J Environ Pathol Toxicol Oncol** 1999; 18:251-9.

Richmond A, Thomas HG. Purification of melanoma growth stimulatory activity. **J Cell Physiol** 1986; 129:375-84.

Roesler R, Walz R, Quevedo J, et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Brain Res Mol Brain Res** 1999; 71:349-53.

Rolny C, Mazzone M, Tugues S, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. **Cancer Cell** 2011; 19:31-44.

Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. Glycosylation and prion protein. **Curr Opin Struct Biol** 2002; 12:578-86.

Sakudo A, Lee DC, Li S, et al. PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 328:14-9.

Sales N, Hassig R, Rodolfo K, et al. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. **Eur J Neurosci** 2002; 15:1163-77.

Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. **J Cell Biol** 2005; 169:341-54.

Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell** 2000; 101:199-210.

Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, et al. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. **J Mol Biol** 2001; 314:1209-25.

Schorl C, Sedivy JM. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. **Methods** 2007; 41:143-50.

Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, et al. Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by recombinant Sendai virus and its modulation by exogenous IFN-beta gene. **J Immunol** 2006; 177:3564-76.

Singh AD, Rennie IG, Kivela T, Seregard S, Grossniklaus H. The Zimmerman-McLean-Foster hypothesis: 25 years later. **Br J Ophthalmol** 2004; 88:962-7.

Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunol Lett** 2009; 123:97-102.

Song Y, Masison DC. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). **J Biol Chem** 2005; 280:34178-85.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell** 1987; 51:229-40.

Stam-Posthuma JJ, Van Duinen C, Scheffer E, Vink J, Bergman W. Multiple primary melanomas. **J Am Acad Dermatol** 2001; 44:22-7.

Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nat Med** 2006; 12:895-904.

Suemizu H, Monnai M, Ohnishi Y, Ito M, Tamaoki N, Nakamura M. Identification of a key molecular regulator of liver metastasis in human pancreatic carcinoma using a novel quantitative model of metastasis in NOD/SCID/gammacnull (NOG) mice. **Int J Oncol** 2007; 31:741-51.

Sy MS, Li C, Yu S, Xin W. The fatal attraction between pro-prion and filamin A: prion as a marker in human cancers. **Biomark Med** 2010; 4:453-64.

Tan MH, Chu TM. Characterization of the tumorigenic and metastatic properties of a human pancreatic tumor cell line (AsPC-1) implanted orthotopically into nude mice. **Tumour Biol** 1985; 6:89-98.

Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol** 2002; 2:569-79.

Tian M, Cui YZ, Song GH et al. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. **BMC Cancer** 2008; 8:241.

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, Van Dijk JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiol Mol Biol Rev** 2000; 64:515-47.

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. **Nature** 1996; 380:639-42.

Toth B, Lok CA, Boing A, et al. Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. **Am J Reprod Immunol** 2007; 58:389-402.

Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS. Biomarkers: mining the biofluid proteome. **Mol Cell Proteomics** 2005; 4:409-18.

Walsh N, O'donovan N, Kennedy S, et al. Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic analysis. **Proteome Sci** 2009; 7:3.

Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia** 1999; 40:1679-82.

Wang TH, Chao A, Tsai CL, et al. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. **Mol Cell Proteomics** 2010; 9:1873-84.

[WHO] World Health Organization. **Skin cancers**. Available from: <URL:<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en>> [2011 abril 3].

Wu CC, Chen HC, Chen SJ, et al. Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. **Proteomics** 2008; 8:316-32.

Xue H, Lu B, Zhang J, et al. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. **J Proteome Res** 2010; 9:545-55.

Yang AS, Chapman PB. The history and future of chemotherapy for melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 2009; 23:583-97, x.

Yehiely F, Bamborough P, Da Costa M, et al. Identification of candidate proteins binding to prion protein. **Neurobiol Dis** 1997; 3:339-55.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-16.

Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC, Slominski A. Current concepts of metastasis in melanoma. **Expert Rev Dermatol** 2008; 3:569-85.

Anexo 1 - Artigo publicado na revista *Stem Cells*

Running title: STI1-PrP^C in neural progenitor/stem cells biology

Enhanced neural progenitor/stem cell self-renewal via the interaction of stress inducible protein 1 with the prion protein

Santos, T. G.¹; Silva, I. R.¹; **Costa-Silva B.**¹; Lepique, A. P.²; Martins, V. R.¹, and Lopes, M. H.^{3,4*}.

¹ International Center for Research and Education, A. C. Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil.

² Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

³ Department of Cell and Developmental Biology, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Brazil.

⁴ Ludwig Institute for Cancer Research, Hospital Alemao Oswaldo Cruz, Sao Paulo, Brazil.

Author contribution: Santos TG: conception and design, collection and assembly of data and manuscript writing; Silva IR: collection and/or assembly of data; Costa-Silva B: collection and/or assembly of data; Lepique AP: data analysis and interpretation; Martins VR: data analysis and interpretation; manuscript writing; final approval of manuscript; Lopes MH: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing and final approval of manuscript.

* **Corresponding author:** Dr. Marilene Hohmuth Lopes, Department of Cell and Developmental Biology, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Professor Lineu Prestes, 1524, room 428. Zip Code: 05508-000, Butanta, Sao Paulo, Brazil.

Phone: 55 11 3091 7250 Fax: 55 11 3091-7402. Email: marilenehl@yahoo.com.br

Abbreviations: PrP^C- cellular prion protein; STI1-stress inducible protein 1.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 07/08410-2, 03/13189-2), Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT) and Ludwig Institute for Cancer Research. VRM is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. Fellowships from FAPESP to T.G. Santos, I. R. Silva and B. Costa-Silva are gratefully acknowledged.

Keywords: PrP^C/STI1/neurospheres/self-renewal/proliferation.

Abstract

Prion protein (PrP^C), when associated with the secreted form of the stress inducible protein 1 (STI1), plays an important role in neural survival, neuritogenesis, and memory formation. However, the role of the PrP^C-STI1 complex in the physiology of neural progenitor/stem cells is unknown. In the current report, neurospheres cultured from fetal forebrain of wild-type (*Prnp*^{+/+}) and PrP^C-null (*Prnp*^{0/0}) mice were maintained for several passages without the loss of self-renewal or multipotentiality, as assessed by their continued capacity to generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. The homogeneous expression and co-localization of STI1 and PrP^C suggests that they may associate and function as a complex in neurosphere-derived stem cells. The formation of neurospheres from *Prnp*^{0/0} mice was reduced significantly compared to their wild-type counterparts. In addition, blockade of secreted STI1, as well as its cell surface ligand, PrP^C, with specific antibodies, impaired *Prnp*^{+/+} neurosphere formation without further impairing the formation of *Prnp*^{0/0} neurospheres. Alternatively, neurosphere formation was enhanced by recombinant STI1 application in cells expressing PrP^C, but not in cells from *Prnp*^{0/0} mice. The STI1-PrP^C interaction was able to stimulate cell proliferation in the neurosphere-forming assay, whereas no effect upon cell survival or the expression of neural markers was observed. These data suggest that the STI1-PrP^C complex may play a critical role in neural progenitor/stem self-renewal via the modulation of cell proliferation, leading to the control of the stemness capacity of these cells during nervous system development.

Introduction

Prion protein (PrP^C) is a cell surface glycoprotein that has been studied intensively due to its role in transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) (1-3). PrP^C has also been shown to have physiological functions governing nervous system development (4). During the development of the central nervous system (CNS), multipotent neural progenitor/stem cells generate neurons or glial cells in a finely-tuned process modulated by both intrinsic factors and extracellular molecules that act as positive or negative regulators (5). For example, soluble factors such as epidermal growth factor (EGF), brain derived neural growth factor (BDNF) (6, 7) and/or the extracellular matrix (ECM) proteins laminin and heparan sulfate are able to control cell fate status, including the self-renewal, proliferation, survival, migration, and differentiation of neural progenitor cells (8).

PrP^C has been considered to be a pivotal molecule in the brain, able to orchestrate a wide range of neurotrophic signaling events, with roles in brain development as well as neural plasticity in the adult brain(4). The ability of PrP^C to bind ECM proteins and support their proper organization, and to modulate the activity of ion channels, G-protein coupling receptors, and soluble factors, is likely to be the basis of its neurotrophic functions (9, 10). The ECM constitutes an essential source of instructive signals capable of regulating the behavior of progenitor/stem cells in the developing CNS (11). At least three PrP^C partners, namely laminin (12), vitronectin (13) and heparan sulfate proteoglycan (HSPG) (14) have been described as important modulators of neural stem/progenitor biology (15-17). The laminin/ β 1 integrin complex, a well known component of the dynamic stem cell niche in many tissues, contributes to neural progenitor/stem cells maintenance by controlling cell proliferation and survival (8, 11, 15, 18). The role of vitronectin and HSPG in neural progenitor/stem cell behavior involves modulation of the activity of soluble factors. For example, vitronectin, when associated with the secreted signaling protein Sonic Hedgehog, is able to stimulate motor neuron differentiation from neuroepithelial cells (16). In addition, HSPG binds to basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and acts as a co-receptor for bFGF, a

molecule crucial for the normal proliferation and differentiation of neural stem cells in the developing cerebral cortex (17).

PrP^C also associates with the soluble form of Stress Inducible Protein 1 (STI1), a co-chaperone protein with neurotrophic properties (10, 19). STI1 binds to PrP^C through specific domains that have been mapped to residues 113-128 for PrP^C and 230-245 for STI1 (19). STI1 is a ubiquitous protein with abundant expression beginning as early as embryonic day 8 (E8) in mouse nervous system development (20). STI1 presents a spatial-temporal expression pattern similar to its ligand, PrP^C, which itself has been described to be expressed as early as E7.5 (13, 21, 22). The STI1 protein is normally found either free or complexed with heat shock proteins (Hsp) in the cytoplasm, with a small fraction localized to the nucleus (23). The secreted form of STI1 has been observed in various cell types (10, 24, 25) and tumor samples (26). Soluble STI1 has autocrine/paracrine activity via its binding to PrP^C, which triggers mechanisms involved in development and neural plasticity, such as neuritogenesis, neuroprotection against staurosporin-induced cell death, and memory formation (10, 19, 25, 27-29). Recently, it has been shown that STI1-PrP^C-related processes require $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) activation for the transduction of extracellular signals (30).

Remarkably, a growing number of reports point out to potential involvement of PrP^C in regulating stem cell self-renewal and/or proliferation. For example, PrP^C not only is expressed on the surface of long-term repopulating hematopoietic stem cells, it is necessary for hematopoietic stem cell self-renewal capacity, as shown in PrP^C-null mice (31). On the other hand, PrP^C expression in the proliferating regions of the adult brain was found to be restricted to post-mitotic neurons, suggesting an indirect effect upon the proliferation of the underlying mitotic precursors (32). Interestingly, treatment of human embryonic stem cells (hESC) with recombinant PrP^C was able to delay spontaneous differentiation, contributing to maintenance of the high proliferative status observed in these cells (33).

Given the importance of PrP^C in nervous system development and evidence implicating its partner STI1 as a novel neurotrophic factor with functions in neural plasticity mechanisms, we designed the present study to investigate the role of PrP^C-STI1 interaction in cell fate-related mechanisms. To this end, we employed neurosphere cultures as a model to study neural progenitor/stem cell physiology.

Material and Methods

Reagents.

Mouse recombinant STI1 was purified as described previously (19). Epidermal Growth Factor (EGF) and basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) were purchased from Sigma. Synthetic STI1 peptide (sequence: 230-ELGNDAYKKKDFDKAL-245) was synthesized by Genescript. Monoclonal PrP^C antibody (6H4) was purchased from Prionics, polyclonal antibodies against STI1 (anti-STI1) and PrP^C (anti-PrP^C) were previously characterized (19, 27). Anti-BrdU, anti-GAPDH and anti-cleaved-caspase 3 were purchased from Chemicon, Ambion, and Cell Signaling, respectively. Anti-Ki67 and anti-PCNA were from DAKO and Zymed, respectively. The neural markers anti-nestin, anti-GFAP, and anti- β III-tubulin were from BD, Chemicon, and DAKO, respectively.

Animals.

PrP^C-null mice, namely Zrchl *Prnp*^{0/0} was provided by Dr Charles Weissmann (34). Zrchl *Prnp*^{+/+} mice were generated by crossing F1 descendants from 129/SV and C57BL/6J matings. The animals were treated in accordance with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) Guide (1999). The experimental procedures were approved by the Fundação Antônio Prudente Ethics Committee for animal research (Process number: 025/08).

Neurosphere primary culture.

Primary cultures of neurospheres were isolated from E14 forebrain of

wild-type and *Prnp*^{0/0} mice. Forebrain was aseptically dissected in HBSS (Invitrogen) and treated with trypsin (0.25%) for 20 min at 37 °C. Trypsin was washed out and cells were mechanically dissociated in DMEM-F12 medium containing B-27 supplement (Invitrogen), Glutamine (2mM; Invitrogen), penicillin (100 IU) and streptomycin (100 µg/ml; Invitrogen). Cells were cultured in the presence of 20 ng/ml each of EGF and bFGF at 37 °C and 5% CO₂. After 7 days *in vitro* (DIV 7), neurospheres were dissociated for use in all assays. In neurosphere cloning assay, 200 cells per well were plated on 96-well plates and incubated for 7 days at 37 °C and 5% CO₂. Every two days, cells were treated with recombinant STI1, anti-STI1, or anti-PrP^C antibodies. Neurospheres were imaged with a phase contrast microscope, and the number and diameter were measured using ImageJ software (NIH). Neurosphere diameter was estimated by tracing a line across the center of the sphere, which length was determined in µm.

Immunofluorescence.

Whole neurospheres from wild-type and *Prnp*^{0/0} mice were harvested, fixed with 4% paraformaldehyde, and paraffin embedded. Sections (3-5 µm) were deparaffinized, rehydrated, and submitted to epitope retrieval by microwave in 10 mM citrate buffer (pH 6.4) and treated with 50 mM glycine. Sections were hydrated and blocked with PBS containing 0.2% Triton-X100 and 20% goat serum at room temperature (RT) for 1 hour. Sections were incubated at RT for 16 hours with anti-PrP^C (1:250), anti-STI1 (1:100), anti-βIII-tubulin, anti-GFAP, anti-nestin, anti-BrdU (1:100), anti-Ki67 (1:50) or anti-PCNA (1:100) antibodies in TBS 0.1% Triton-X100 with 1% goat serum. Following washes, anti-mouse Alexa-568 (Molecular Probes) 1:3,000, or anti-rabbit Alexa-488 (Molecular Probes) 1:3,000 was incubated for 1 hour at RT followed by DAPI staining.

Dissociated neurosphere cells were obtained by treatment with trypsin (0.25%) in HBSS for 20 min at 37 °C. The trypsin was washed out, and cells were mechanically dissociated in DMEM-F12. Cells (1×10^5 cells) were plated on coverslips coated with poly-L-lysine and treated with retinoic acid

(100 nM), BMP-2 (50 ng/ml), or IGF-1 (500 ng/ml), for 48 h at 37 °C. Cells were washed with PBS and fixed for 20 min at RT with 4% paraformaldehyde. After rinsing, cells were blocked for 1 h at RT with blocking solution. Cells were incubated at RT for 16 hours with anti- β III-tubulin, anti-GFAP or anti-nestin. After washing, secondary antibodies fluorescent-conjugated plus DAPI were incubated as described above. Immunolabeled cells were imaged using a Leica TCS SP5 II laser scanning confocal system with the LAS AF software package.

Immunoblotting analysis.

Protein extracts or conditioned medium (CM) from *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres were analyzed. CM was centrifuged (10,000 x g), filtered (20 μ m filter), and 50X concentrated (Minicon, Millipore). Protein extracts (40 μ g) or CM was subject to 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with polyclonal anti-ST11 (1:10,000), anti-PrP^C (1:1000), anti-Nestin (1:1000), anti-GFAP (1:1000) or anti- β -tubulin (1:1000) antibodies. Anti-actin polyclonal antibodies (1:200, Sigma) were used as protein loading controls for cell extracts. Anti-GAPDH antibody was used as a cell lysis control.

Flow cytometry.

Non-permeabilized cells. Cells (10^5) were dissociated, washed twice with PBS, and incubated with polyclonal anti-PrP^C (1:100) antibody in PBS containing 5% BSA for 30 minutes at 4 °C. After washes, samples were incubated with anti-mouse IgG Alexa-568 antibody at 1:3,000 for 30 min at 4 °C.

Permeabilized cells. Cells (10^5) were dissociated, fixed and permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm Plus kit according to the manufacture's instructions. The double labeling was performed by combinations of antibodies (anti-nestin, anti-GFAP, or anti- β III-tubulin) in PBS containing 5% BSA for 30 min on ice. Anti-mouse Alexa-568 (1:3,000), anti-rabbit Alexa-488 (1:3,000) was incubated for 30 min at 4 °C. Flow cytometry was performed using a FACSCalibur (Becton Dickinson)

instrument. Cells were analyzed for forward scatter, side scatter, and fluorescence using an argon laser (480 nm excitation, 520 nm emission).

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

96-well plate was coated with CM (50 μ l) overnight at 4 °C. Wells were washed with PBS plus 0.3% Triton X-100, blocked with PBS containing 5% nonfat milk, and incubated for 2 h at 37 °C. Anti-ST11 (7 μ g/ml) antibody was incubated for 2 h at 37 °C. After washing, anti-rabbit IgG-HRP (1:2,000, GE Healthcare) was incubated for 1 hour at 37 °C, followed by the addition of orthophenylenediamine solution (0.33 mg/ml in 0.5 M citrate buffer, pH 5.2, and 0.4% hydrogen peroxide) for 5 min at RT. The reaction was halted by the addition of 4 M sulfuric acid. Absorbance (490 nm) was measured using a Bio-Rad Benchmark microplate reader.

Cell death assay.

Dissociated cells (2×10^5) were grown on poly-L-lysine coated coverslips and incubated with ST11 (1 or 2 μ M) or control buffer (TBS) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Staurosporine (50 nM) was used as positive control. Cell cultures were fixed for 20 min at RT and incubated at RT for 1 h with antibody against cleaved-caspase 3 (1:100) diluted in PBS containing 1% BSA. Anti-rabbit IgG Alexa 488 (1:3,000) plus DAPI was incubated for 1h. Cells were imaged by fluorescence microscopy and the percentage of cleaved-caspase 3-positive cells in the total population (DAPI counterstained) was quantified. At least three microscopic fields (200 cells/field) were counted in each group.

Proliferation assays.

Thymidine incorporation. Neurospheres cultured were treated as described above and pulsed with 0.4 mCi [³H] thymidine per well for 16 h at 37 °C and 5% CO₂. Neurospheres were imaged with a contrast phase microscope and counted. Cells were washed with PBS and lysed with 1% SDS for 15 min at RT and [³H] thymidine incorporation was measured in cell

lysates. The ratio between the number of spheres formed per cpm was plotted.

BrdU incorporation. Neurospheres treated 16 h with STI1 (0.5 μ M or 1 μ M) at 37 °C and 5% CO₂ were pulsed with 30 μ M BrdU for 2 h at 37°C. Dissociated cells were washed and BrdU immunostaining was performed using BD BrdU Flow kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Flow cytometry analysis was performed as described previously.

Statistical analysis.

Results are represented as mean \pm standard error and the number of experiments performed is specified in the respective figure legends. Data were compared by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test or single mean Student's *t* test. In all cases, *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Neurosphere culture characterization.

Neurosphere cultures were obtained from the E14 forebrains of wild-type (*Prnp*^{+/+}) and knockout (*Prnp*^{0/0}) mice. *Prnp*^{+/+} cells were maintained for several passages in the presence of EGF and bFGF without apparent loss of either self-renewal or multipotentiality, as reflected by their continuous capacity to differentiate into neurons (Fig. 1A, *left*), astrocytes (*center*), or oligodendrocytes (*right*) upon exposure to differentiation protocols using retinoic acid, BMP-2, or IGF-1 respectively (Fig. 1A). Similar pattern was observed in *Prnp*^{0/0} cells (data not shown). These results confirm that sphere-forming cells represent typical neural progenitor/stem cells.

To evaluate the profile of neural markers expression in neurospheres, undifferentiated cells, astrocyte-committed cells, and newborn neurons were identified using antibodies against nestin, GFAP, and β III-tubulin, respectively. Neurospheres derived from both *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mouse embryos expressed the three neural markers at similar levels, as assessed

by semi-quantitative western blotting analysis (Fig. 1B) as well as by immunophenotyping of the cell population using flow cytometry (Fig. 1C and D). The majority of cells were found to be double-positive, indicating that neurosphere cells express neuronal, glial, or undifferentiated markers (Fig. 1C and D). In addition, *in situ* immunofluorescence of neurosphere sections confirmed the expression of the three neural markers in cells derived from wild-type and *Prnp*^{0/0} mice (Fig. 1E). Remarkably, the pattern of immunoreactivity was uniform for β III-tubulin and GFAP, whereas nestin expression presented a peculiar staining, with most of the positive cells being located at the neurosphere periphery (Fig. 1E). These findings suggest that neurosphere borders could represent a niche for undifferentiated cells, probably due to the continuous exposure of these cells to mitogenic factors present in the medium.

To address whether the nestin-positive cells represent dividing cells, these cells proliferative status was assessed by BrdU incorporation. In agreement with the observed nestin distribution, BrdU-positive cells were preferentially located at the neurosphere periphery (Fig. 1F), indicating that neurosphere borders represent a region conducive to cell proliferation. This finding cannot be attributed to improper BrdU infiltration into the neurosphere mass, as the same staining pattern was observed using endogenous nuclear markers of proliferation such as Ki67 and PCNA (Fig. 1G).

Expression and distribution of PrP^C and STI1 in neurospheres.

STI1 and PrP^C expression patterns were examined in whole neurosphere cultures using confocal fluorescence microscopy. Neurosphere sections derived from *Prnp*^{+/+} cells showed strong and unvarying immunoreactivity for both PrP^C and STI1 (Fig. 2A, *upper panels*). No signal was observed with the respective control antibodies (data not shown). Immunoreactivity for PrP^C and STI1 colocalizes in *Prnp*^{+/+} neurospheres (Fig. 2A, *middle panels, merge*), suggesting that these proteins may interact in progenitor cells. High expression levels were also observed for STI1 in

Prnp^{0/0} neurospheres despite the absence of PrP^C expression (Fig. 2A, *lower panels*).

Levels of STI1 and PrP^C protein were also examined by immunoblotting in homogenates from *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres. Figure 2B shows that STI1 protein levels are similar in neurospheres from both genotypes, indicating that STI1 expression is independent of PrP^C expression. In order to evaluate whether PrP^C is correctly targeted to the plasma membrane, dissociated non-permeabilized neurosphere cells were analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 2C, PrP^C was detected at the cell surface, demonstrating its proper targeting.

PrP^C plays a role in neurosphere formation

Based on the PrP^C expression observed in progenitor cells, and previous reports showing that PrP^C expression may be a prerequisite in neurogenesis (32), we asked whether PrP^C may be involved in neural progenitor/stem cell maintenance. To address this question, we tested the self-renewal capacity of *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} progenitor cells. Primary neurospheres were dissociated and plated in clonal density in the presence of EGF and bFGF and, at DIV7, the number of secondary neurospheres was counted. Cultures of *Prnp*^{0/0} cells presented fewer neurospheres than wild-type cultures (Fig. 3A). Representative images of *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres are shown in Figures 3B and 3C. We also tested whether the absence of PrP^C expression influences neurosphere size. The bulk of the neurosphere population presented with similar diameters (30–120 μ m) in cultures from both genotypes (Fig. 3D). These data indicate that the ablation of PrP^C reduces the number of neurospheres, but does not influence sphere diameter. Accordingly, the blockage of PrP^C on the cell surface with PrP^C antibody (6H4) led to a significant decrease in the number of neurospheres when compared to control IgG treatment (Fig. 3E). Remarkably, the number of wild-type neurospheres formed in the presence of 6H4 antibody was equivalent to that observed in *Prnp*^{0/0} cultures (Figs. 3A vs. 3E), indicating that PrP^C blockade is able to mimic the phenotype observed for *Prnp*^{0/0}

neurospheres. Using flow cytometry we have shown that 6H4 antibody binds to PrP^C on the cell surface without affecting the protein internalization, leading us to consider a blocking effect for this molecule in our cell cultures (data not shown). Together, these results suggest that PrP^C is a positive regulator of neural progenitor/stem cells self-renewal.

The interaction of STI1 with PrP^C enhances neurosphere formation.

The soluble form of STI1 secreted by astrocytes has been shown to have trophic properties both in neurons and glia (10, 25). We therefore decided to evaluate whether neurosphere cultures are also able to secrete STI1 into the extracellular milieu. The presence of secreted STI1 in the conditioned medium (CM) of *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{+/+} neurosphere cultures was measured by ELISA (Fig. 4A) and immunoblotting (Fig. 4B), and did not differ between the genotypes. To confirm that soluble STI1 in CM is not a result of cell lysis, GAPDH immunostaining was performed. A very weak signal was observed for GAPDH, indicating negligible cell disruption (Fig. 4B).

Considering that secreted STI1 can act as an autocrine factor through binding to PrP^C (10), we asked whether the disruption of this interaction with specific antibodies could impair neurosphere formation. In a neurosphere clonal assay, antibody against STI1 significantly reduced the number of neurospheres in *Prnp*^{+/+} cultures, while no effect was observed in *Prnp*^{0/0} cultures (Fig. 4C). Remarkably, the number of neurospheres formed from *Prnp*^{+/+} cultures treated with an anti-STI1 antibody was equivalent to that obtained when cultures were treated with anti-PrP^C (Fig. 3E), or to that from *Prnp*^{0/0} cultures (Fig. 4C). Conversely, increasing the concentration of recombinant STI1 (0.5–2.0 μM) significantly improved the formation of *Prnp*^{+/+}, but not *Prnp*^{0/0}, neurospheres.

Our previous findings showed that a STI1 peptide (STI1 230-245), which contains the PrP^C binding site, is able to mimic the effects of full-length STI1 protein in neurogenesis, neuroprotection, and memory consolidation (28, 29). However, in neurosphere forming assays, the STI1230-245 peptide was unable to reproduce the effects of STI1 (Fig. 4D), suggesting that other

STI1 domains are required for its proper activity on neurospheres. We further assessed whether STI1 treatment affected the size of neurospheres. As indicated in Figure 4E, STI1 treatment increased the percentage of smaller neurospheres (10-30 μm) in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} populations when compared to untreated cells (Fig. 3D). Together, these results support the concept that secretable STI1, via its interaction with PrP^C, is important for neurosphere formation.

STI1-PrP^C complex formation enhances the proliferation, but not the survival, of neural progenitor/stem cells.

To confirm the effects of STI1 upon neural progenitor/stem cells self-renewal, we conducted cell proliferation assays using [³H]-thymidine incorporation. STI1 treatment significantly increases the ratio of [³H]-thymidine incorporation (cpm) per number of *Prnp*^{+/+} neurospheres (Fig. 5A). In accordance with our previous results, STI1 treatment had no effect upon *Prnp*^{0/0}-derived neurospheres. The positive effect of STI1-PrP^C binding upon the proliferation of neurospheres was also confirmed by BrdU incorporation assays (Fig. 5B).

As our previous studies reported the neuroprotective effect promoted by the STI1-PrP^C interaction (19, 27, 29), here we addressed whether STI1-PrP^C affected neurosphere survival. The presence of cleaved caspase-3 was evaluated in dissociated neurospheres treated with STI1. As depicted in Fig. 5C, the activity of caspase-3 was not altered. Thus, STI1 treatment has no effect on cell survival, even at a high STI1 concentration (2 μM). These results indicate that enhancement in the number of neurospheres that results from the PrP^C-STI1 association is caused by the increased proliferation of neural progenitors/stem cells instead of enhanced cell survival.

The pattern of neural markers is not altered by STI1.

To further characterize whether the continuous exposure of neurosphere cultures to STI1 modifies the expression pattern of neural markers, we conducted flow cytometry analysis using antibodies against

specific neural markers. As shown in Figure 6A, no significant differences were found in the expression levels of neuronal, glial, or undifferentiated markers between wild-type and *Prnp*^{0/0} neurospheres. Representative histograms from *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} cells following STI1 treatment are shown in Figure 6B. These results demonstrate that STI1 treatment does not modify the expression pattern of committed vs. uncommitted cells.

Discussion

In this study, we demonstrate that the interaction between PrP^C and STI1 promotes neural progenitor/stem cell self-renewal. The major observations supporting this conclusion are as follows: 1) PrP^C and STI1 are homogeneously expressed and colocalize in neurospheres; 2) *Prnp*^{0/0} progenitor/stem cells generate relatively fewer neurospheres than do wild-type cells; 3) STI1 is secreted by neurospheres, confirming its previous characterization as an autocrine neurotrophic factor; 4) neutralizing antibodies against STI1 or PrP^C impair neurosphere formation; 5) The PrP^C-STI1 interaction potentiates neurosphere proliferation, but has no effect upon neural progenitor/stem cell fate or survival.

Observations that PrP^C is expressed in a variety of neurons and glial cells during brain development suggest that this protein may be involved in neural stem cell-fate mechanisms (4). High PrP^C-expressing cells have been reported to regulate neural precursor proliferation in the pre- and post-natal CNS (32). In mouse embryonic stem cells (ES), recombinant PrP is able to control self-renewal capacity and differentiation status (33). Moreover, PrP^C expression is increased during spontaneous ES differentiation, and a positive correlation between PrP^C and nestin expression is observed after the induction of differentiation, suggesting that PrP^C could be involved in determining neural fate (34).

Several studies have shown that PrP^C is involved in neurotrophic signal transduction via interactions with a number of partners (4, 9). At least two important transmembrane proteins with well-established neurotrophic activities have been identified as PrP^C ligand, namely, neural cell adhesion

molecule (NCAM) (35) and 37-kDa/67-kDa Laminin Receptor Precursor (37LRP/67LR) (36, 37). NCAM plays important roles in the developing and the adult brain, including pivotal functions in neuronal differentiation and neurite outgrowth (38). PrP^C interacts directly with NCAM, leading to the stabilization of NCAM in lipid rafts and the activation of p59^{fyn} to induce NCAM-dependent neuritogenesis (39).

PrP^C can also modulate indirectly 37LRP/67LR-dependent neurotrophic activities, including cell adhesion and signal transduction, through its binding to this receptor (40, 41). In addition, PrP^C is able to associate with ECM proteins, such as laminin and vitronectin. These interactions modulate neurite outgrowth in hippocampal neurons and axonogenesis in peripheral neurons, which may be relevant to the neurotrophic activity of PrP^C (12, 13). Interestingly, the integrins, the major ECM receptors, also regulate fundamental processes in neural stem cells, such as progenitor proliferation and survival, thus contributing to their maintenance (15, 18). Strikingly, integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ activity is upregulated in PrP^C-vitronectin mediated axonogenesis (13). This interaction is the only compensatory mechanism proposed, so far, to balance the absence of PrP^C in knockout mice, which in turn may explain the lack of altered phenotype in these animals (34).

Our group recently described the association of PrP^C with the type I metabotropic glutamate receptor (mGluR1/5) when it is engaged with laminin (42), strengthening the idea that PrP^C is able to assemble different signaling platforms, in this case coupling to metabotropic glutamate receptors, which are also involved in neural precursor differentiation and proliferation (43). Nonetheless, the functional implications of PrP^C binding to laminin as well as vitronectin, NCAM, and 37LRP/67LR upon neural precursors/stem cell self-renewal remain to be elucidated.

One of the most studied PrP^C-interacting partners is soluble STI1 (19, 44). Since the PrP^C-STI1 complex was first characterized, several reports have implicated STI1 as a necessary component for the induction of PrP^C-mediated neurotrophic effects (10, 19, 25, 27, 29). STI1 can be released by

cultured astrocytes and, once in the extracellular milieu, it can induce internalization of its receptor, PrP^C, which modulates distinct events in brain development, such as differentiation, and protects against cellular insults (10, 25, 45). In neurons, STI1 transduces neuroprotective signals through the activation of PKA and also promotes Erk and PI3-K/mTOR activity that is involved in neuritogenesis (29, 46). We have also identified α 7nAChR as the transmembrane protein responsible for the signal transduction of STI1-PrP^C, which promotes calcium influx that is necessary to trigger neuronal survival and differentiation (30). These receptors are expressed during development, from undifferentiated precursors to fully-committed neural cells (47) and participate in several neural processes such as neurite outgrowth and neuroprotection via their Ca²⁺ permeability (48, 49). Given evidence showing that PrP^C can organize signaling platforms, we are actively investigating the participation of the α 7nAChR in the signal transduction mediated by the STI1-PrP^C interaction in neural progenitor/stem cell self-renewal.

Recently, the human homologue of STI1, also known as Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein), was shown to facilitate the phosphorylation and nuclear translocation of STAT3 (signal transducer and activator of transcription) in ES cells, implying a role for the Hsp70/Hsp90 chaperone heterocomplex machinery in pluripotency signaling (50). In this case, it is reasonable to believe that the cytoplasmic/nuclear translocation of STI1 and its role in pluripotency may not be correlated with PrP^C binding, as PrP^C is localized predominantly to the cell surface (51). Interestingly, the main partners of STI1, the chaperones Hsp70 and Hsp90, have been associated with key cellular mechanisms in neural stem/progenitor cells. Hsp70 is able to mediate neuroprotection and increase the survival of adult neuronal precursor cells following focal cerebral ischemia in mice (52). In addition, Hsp90 is involved in the regulation of the hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells (53).

Given the evidence above, the current study assessed the role of STI1-PrP^C complex in neural stem cell biology, using a well-established model of neural stem cell culture. We observed that neurospheres from wild-

type and *Prnp*^{0/0} mice presented similar expression pattern and levels of GFAP, β III-Tubulin and nestin under sphere-forming conditions (in the presence of growth factors). Using different approaches or cells types, some reports have shown significant changes in the differentiation status (uncommitted vs committed cells) as assessed by nestin expression in wild-type and *Prnp*^{0/0} cells (32, 54). Steele and colleagues showed that PrP^C-expressing precursors differentiate from their multipotent state (after withdrawal of bFGF) faster than those from *Prnp*^{0/0} ones, indicating that PrP^C levels are related to neural precursors differentiation (32). Peralta and colleagues showed that PrP^C expression in ES cells is associated to differentiation from pluripotent to multipotent neural status, which is also correlated with nestin expression (54). Furthermore, previous data from our laboratory have shown that cerebral cortex and hippocampus from *Prnp*^{0/0} E17 mouse brain present higher content of nestin and lower GFAP levels when compared to wild-type ones, indicating that PrP^C present a role in differentiation of the developing brain (25). In fact, these findings indicated that PrP^C expression accompanies the neural differentiation process in distinct cell contexts, although its absence could be partially compensated by other molecules leading to a slower differentiation process.

We have also presented evidence that PrP^C participates of neural precursors self-renewal since *Prnp*^{0/0} cells generated less neurospheres than wild-type ones. Indeed, long-term hematopoietic stem cells (LT HSC) from *Prnp*^{0/0} bone marrow exhibits impaired self-renewal in serial transplantation of lethally irradiated mouse recipients, which is a hallmark of LT HSC to determine the capacity of cell population to reconstitute the bone marrow (31). One of the mechanisms proposed to explain how PrP^C could sustain self-renewal would be its property to protect cells against different apoptosis-related signals, such as bax-mediated cell death (55-57), staurosporine-induced cell death (27, 29, 30, 58) and hypoxic-ischemic insults (59-61). Remarkably, PrP^C-ST11 engagement protected undifferentiated postmitotic cells in retina explants, as well as dissociated hippocampal neurons subject to induced cell death (27, 29). On the other hand, the cytoprotective signals

triggered by PrP^C-STI1 were not observed in our findings, as measured by cleaved caspase 3 detection assay. It is well known that after neurosphere dissociation most of the viable cells die, since the culture conditions do not support the survival of the majority of the cells (62) even in the presence of neuroprotective molecules as PrP^C and/or STI1.

Conversely, STI1, in a PrP^C dependent manner, was able to regulate the proliferation, which in turn promotes the enhancement of neural stem cell self-renewal. Some reports have shown the participation of PrP^C in cell proliferation. In the adult CNS, PrP^C expression levels correlates with the rates of neural precursors proliferation in subventricular zone and dentate gyrus *in vivo* (32). Lee and Baskakov showed that the addition of recombinant PrP^C helps to maintain high proliferation activity during spontaneous differentiation of hESCs (33). Interestingly, we have shown that the engagement of secreted STI1 to cell surface attached-PrP^C promotes proliferation of glioblastoma-derived cell line (63). Therefore, our findings corroborate the previous evidence, which associates PrP^C expression with cell proliferation.

Based on previous and current data, we have strengthened the idea that STI1 can be considered a neurotrophin due to its indubitable properties in neural progenitors/stem cell behavior in complex with PrP^C during brain development. In addition, it will be important to define PrP^C-STI1 complex role in adult neural progenitors/stem cell self-renewal, which may help build the rationale for novel therapeutic strategies for the treatment of acute brain injuries such as ischemia or trauma, as well as for chronic neurodegenerative illness such as Alzheimer or prion diseases.

Conclusion

The current findings support the concept that PrP^C and STI1 are necessary for the continued maintenance of neural stem cells. The capacity for self-renewal is vital because it allows a stem cell population to perpetuate. Therefore, the stem cell must integrate proliferation control with the maintenance of an undifferentiated state. It is possible that the PrP^C-STI1-

dependent regulation of neural progenitor/stem self-renewal and proliferation may also operate *in vivo* during normal development and/or following injury to the CNS.

Acknowledgements

We are thankful to Carlos F. Nascimento for technical assistance.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors declare no potential conflicts of interests.

Figure Legends

Figure 1. Neural marker expression in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres.

(A). Dissociated *Prnp*^{+/+} neurospheres differentiate into neurons (β III-tubulin), astrocytes (GFAP), and oligodendrocytes (Rip) after induction with retinoic acid (100 nM) plus forskolin (5 μ M), BMP-2 (50 ng/ml), or IGF (500 ng/ml), respectively. Nuclei were stained with DAPI (100 ng/ml). (B) Cell extracts from neurospheres were submitted to SDS-PAGE and the content of neural markers and actin (loading control) in neurospheres under basal conditions was analyzed by western blotting. (C) Representative dot-plots from flow cytometry experiments demonstrating *Prnp*^{+/+} cells labeled with neural markers (β III-tubulin/GFAP or β III-tubulin/Nestin) in basal conditions at DIV7. (D) Comparison of neural markers expression between *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} cells. Values represent the mean \pm standard error of seven independent experiments, $p > 0.05$ for all comparisons. (E) Neurosphere suspensions were harvested, fixed, paraffin-embedded, and double-labeled with antibodies against β III-tubulin, GFAP or nestin. Nuclei were stained with DAPI. (F) Fluorescent immunocytochemistry in paraffin-embedded neurosphere sections with anti-BrdU, (G) anti-Ki67 or anti-PCNA antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars = 20 μ m, except in Rip⁺ (Fig 1A, right), which represents 10 μ m.

Figure 2. STI1 and PrP^C expression in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres. (A) *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres were cultured as low-density cell suspensions in the presence of EGF and bFGF. Neurospheres were fixed, paraffin-embedded, and sectioned (3 μm). Fluorescent immunocytochemistry was performed to detect STI1 (green) and PrP^C (red), the nuclei were stained with DAPI (blue). Middle panels represent high magnification images from *Prnp*^{+/+} neurospheres (demarcated area in panel above). (B) Western blotting analysis for PrP^C, STI1, and actin protein expression in extracts from neurospheres. (C) FACS analysis of *Prnp*^{+/+} cells (purple curve) labeled with anti-PrP^C antibody.

Figure 3. PrP^C ablation impairs neurosphere formation. Dissociated primary neurospheres from *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice were cultured at a low density for 7 days in the presence of EGF and bFGF. The (A) number and the (D) diameter of *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres were measured. Values represent the mean ± standard error (vertical bars) of four independent experiments. Representative images of (B) *Prnp*^{+/+} and (C) *Prnp*^{0/0} neurosphere cultures. (E) Cultures were treated with anti-PrP^C antibody (6H4, 6 μg/ml) or control mouse IgG and the number of neurospheres was counted. Values represent the mean ± standard error of three independent experiments. In (A) and (E), single-mean Student's *t* test was used to compare *Prnp*^{+/+} vs. *Prnp*^{0/0} neurospheres or 6H4 vs. control IgG. In (D), ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used. *p<0.01. Scale bars = 200 μm.

Figure 4. STI1 treatment increases neurosphere formation in a PrP^C-dependent manner. (A) ELISA quantification of STI1 content in conditioned medium from *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurosphere cultures (n=3). (B) Immunoblotting of conditioned medium from neurospheres *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} developed with anti-STI1 and anti-GAPH (lysis control) antibodies. (C) Cells were treated with antibodies against STI1 (6 μg/ml) or rabbit pre-immune IgG, and the number of neurospheres was counted (n=3). (D) The

number of neurospheres treated with increasing concentrations of recombinant STI1 (0.05 to 2 μ M) or 8 μ M of the STI1230-245 peptide. (E) Range of neurosphere diameters following exposure to STI1 (1 μ M). Values represent the mean \pm standard error of five independent experiments. * p <0.05 (ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

Figure 5. STI1 promotes the proliferation of neurosphere cells. Dissociated primary *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurosphere cells were treated with STI1 for 16 h. (A) Neurosphere cultures were pulsed with [³H]thymidine (1 mCi/ml) for 16 h. Neurospheres were quantified and then harvested for radioactivity measurements. Values represent the ratio between CPM vs. the number of neurospheres (n=7). (B) neurospheres were pulsed with BrdU (30 μ M) in the last 2 h of treatment and submitted to flow cytometry. Comparison between *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} cells treated with STI1 (0.5 or 1.0 μ M; n=3). (C) neurospheres were dissociated and plated on poly-L-lysine coated coverslips for 24 h in the presence of STI1 and cell death was evaluated by the expression of cleaved caspase 3 using specific antibody. Values represent the mean \pm standard error of four independent experiments. * p < 0.05, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Figure 6. STI1 treatment does not alter the expression profile of neural markers in neurospheres. (A) Flow cytometry analysis was performed for neural markers in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurospheres following STI1 treatment. Values represent the mean \pm standard error of five independent experiments. There was no statistical difference between groups. (B) Representative histograms of *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurosphere cultures with and without STI1 treatment.

Reference List

1. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. *CURR. OPIN. STRUCT. BIOL.* 2009;19(1):14-22.
2. Aguzzi A, Heikenwalder M. Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *NAT. REV. MICROBIOL.* 2006;4(10):765-775.
3. Caughey B, Baron GS. Prions and their partners in crime. *NATURE* 2006;443(7113):803-810.
4. Linden R, Martins VR, Prado MA et al. Physiology of the prion protein. *PHYSIOL REV.* 2008;88(2):673-728.
5. Conti L, Cattaneo E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *NAT. REV. NEUROSCI.* 2010;11(3):176-187.
6. Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J. NEUROSCI.* 1995;15(8):5765-5778.
7. Hu Q, Zhang L, Wen J et al. The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells. *STEM CELLS* 2010;28(2):279-286.
8. Campos LS, Decker L, Taylor V et al. Notch, epidermal growth factor receptor, and beta1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells. *J. BIOL. CHEM.* 2006;281(8):5300-5309.
9. Martins VR, Beraldo FH, Hajj GN et al. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *CURR. ISSUES MOL. BIOL.* 2010;12(2):63-86.
10. Lima FR, Arantes CP, Muras AG et al. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J. NEUROCHEM.* 2007;103(6):2164-2176.
11. Loulier K, Lathia JD, Marthiens V et al. beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche. *PLOS. BIOL.* 2009;7(8):e1000176.
12. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *BRAIN RES. MOL. BRAIN RES.* 2000;76(1):85-92.
13. Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J. CELL SCI.* 2007;120(Pt 11):1915-1926.
14. Warner RG, Hundt C, Weiss S et al. Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J. BIOL. CHEM.* 2002;277(21):18421-18430.

15. Campos LS, Leone DP, Relvas JB et al. Beta1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *DEVELOPMENT* 2004;131(14):3433-3444.
16. Pons S, Marti E. Sonic hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation. *DEVELOPMENT* 2000;127(2):333-342.
17. Yamaguchi Y. Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis. *SEMIN. CELL DEV. BIOL.* 2001;12(2):99-106.
18. Leone DP, Relvas JB, Campos LS et al. Regulation of neural progenitor proliferation and survival by beta1 integrins. *J. CELL SCI* 2005;118(Pt 12):2589-2599.
19. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* 2002;21(13):3307-3316.
20. Hajj GN, Santos TG, Cook ZS et al. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. *J. COMP NEUROL* 2009;517(3):371-384.
21. Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C et al. Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *BRAIN RES.* 2007;1139:60-67.
22. Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H et al. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *GENE EXPR.* 2003;11(1):1-12.
23. Daniel S, Bradley G, Longshaw VM et al. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 2008;1783(6):1003-1014.
24. Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *CELL CYCLE* 2004;3(9):1098-1100.
25. Arantes C, Nomizo R, Lopes MH et al. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *GLIA* 2009.
26. Wang TH, Chao A, Tsai CL et al. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. *MOL. CELL PROTEOMICS.* 2010;9(9):1873-1884.
27. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM et al. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 2002;21(13):3317-3326.
28. Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN et al. Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *NEUROBIOL. DIS.* 2007;26(1):282-290.

29. Lopes MH, Hajj GN, Muras AG et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. NEUROSCI.* 2005;25(49):11330-11339.
30. Beraldo FH, Arantes CP, Santos T et al. The role of α 7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress inducible protein 1. *J. BIOL. CHEM.* 2010.
31. Zhang CC, Steele AD, Lindquist S et al. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A* 2006;103(7):2184-2189.
32. Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH et al. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A* 2006;103(9):3416-3421.
33. Lee YJ, Baskakov IV. Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. *J. NEUROCHEM.* 2010;114(2):362-373.
34. Bueler H, Fischer M, Lang Y et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *NATURE* 1992;356(6370):577-582.
35. Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA et al. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. MOL. BIOL.* 2001;314(5):1209-1225.
36. Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S et al. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* 2001;20(21):5863-5875.
37. Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas CI et al. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *NAT. MED.* 1997;3(12):1383-1388.
38. Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V et al. NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J. NEUROSCI. RES.* 2008;86(4):727-743.
39. Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I et al. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. CELL BIOL.* 2005;169(2):341-354.
40. Nelson J, McFerran NV, Pivato G et al. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *BIOSCI. REP.* 2008;28(1):33-48.
41. Hundt C, Peyrin JM, Haik S et al. Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J.* 2001;20(21):5876-5886.

42. Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG et al. Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB J.* 2011;25(1):265-279.
43. Schlett K. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *CURR. TOP. MED. CHEM.* 2006;6(10):949-960.
44. Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *NAT. MED.* 1997;3(12):1376-1382.
45. Caetano FA, Lopes MH, Hajj GN et al. Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J. NEUROSCI.* 2008;28(26):6691-6702.
46. Roffe M, Beraldo FH, Bester R et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *PROC. NATL. ACAD. SCI U. S. A* 2010;107(29):13147-13152.
47. Resende RR, Adhikari A. Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *CELL COMMUN. SIGNAL.* 2009;7:20.
48. Nery AA, Resende RR, Martins AH et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor expression and activity during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *J. MOL. NEUROSCI.* 2010;41(3):329-339.
49. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M et al. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *PHYSIOL REV.* 2009;89(1):73-120.
50. Longshaw VM, Baxter M, Prewitz M et al. Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. *EUR. J. CELL BIOL.* 2009;88(3):153-166.
51. Prusiner SB. Prions. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A* 1998;95(23):13363-13383.
52. Doepfner TR, Nagel F, Dietz GP et al. TAT-Hsp70-mediated neuroprotection and increased survival of neuronal precursor cells after focal cerebral ischemia in mice. *J. CEREB. BLOOD FLOW METAB* 2009;29(6):1187-1196.
53. Xiong L, Zhao T, Huang X et al. Heat shock protein 90 is involved in regulation of hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells. *CELL STRESS. CHAPERONES.* 2009;14(2):183-192.
54. Peralta OA, Huckle WR, Eystone WH. Expression and knockdown of cellular prion protein (PrP(C)) in differentiating mouse embryonic stem cells. *DIFFERENTIATION* 2010.
55. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG et al. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J. BIOL. CHEM.* 2001;276(42):39145-39149.
56. Gains MJ, Roth KA, LeBlanc AC. Prion protein protects against ethanol-induced Bax-mediated cell death in vivo. *NEUROREPORT* 2006;17(9):903-906.

57. Lin DT, Jodoin J, Baril M et al. Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 2008;1783(10):2001-2012.
58. Paitel E, Alves da CC, Vilette D et al. Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J. NEUROCHEM.* 2002;83(5):1208-1214.
59. McLennan NF, Brennan PM, McNeill A et al. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *AM. J. PATHOL.* 2004;165(1):227-235.
60. Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF et al. Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J. NEUROSCI.* 2005;25(39):8967-8977.
61. Weise J, Doeppner TR, Muller T et al. Overexpression of cellular prion protein alters postischemic Erk1/2 phosphorylation but not Akt phosphorylation and protects against focal cerebral ischemia. *RESTOR. NEUROL. NEUROSCI.* 2008;26(1):57-64.
62. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *NAT. METHODS* 2005;2(5):333-336.
63. Erlich RB, Kahn SA, Lima FR et al. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *GLIA* 2007;55(16):1690-1698.

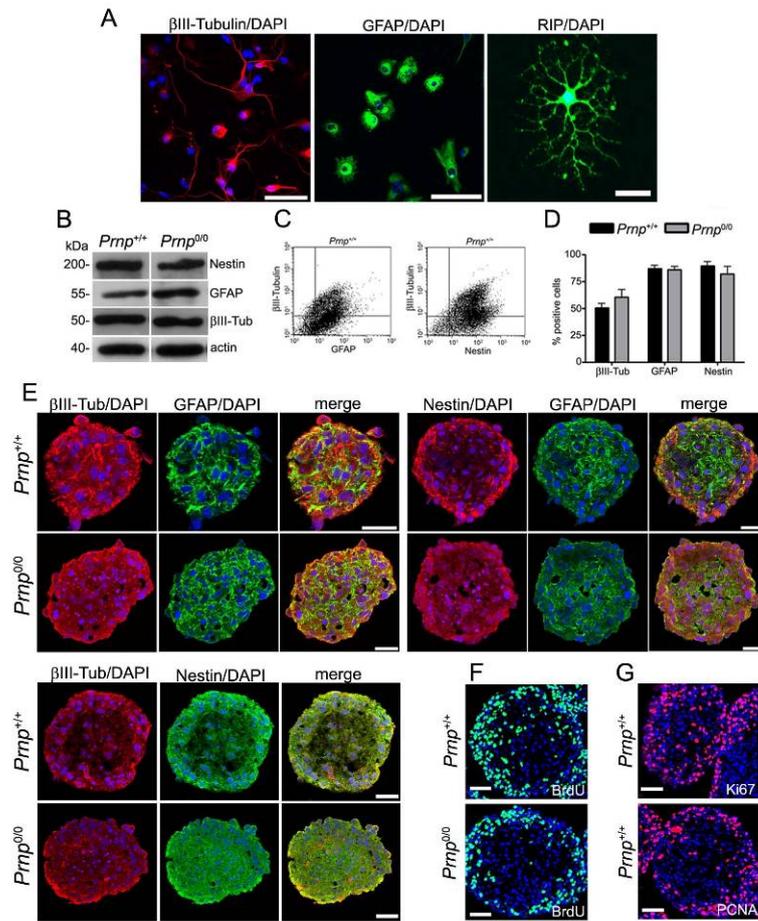


Figure 1

Santos et al.

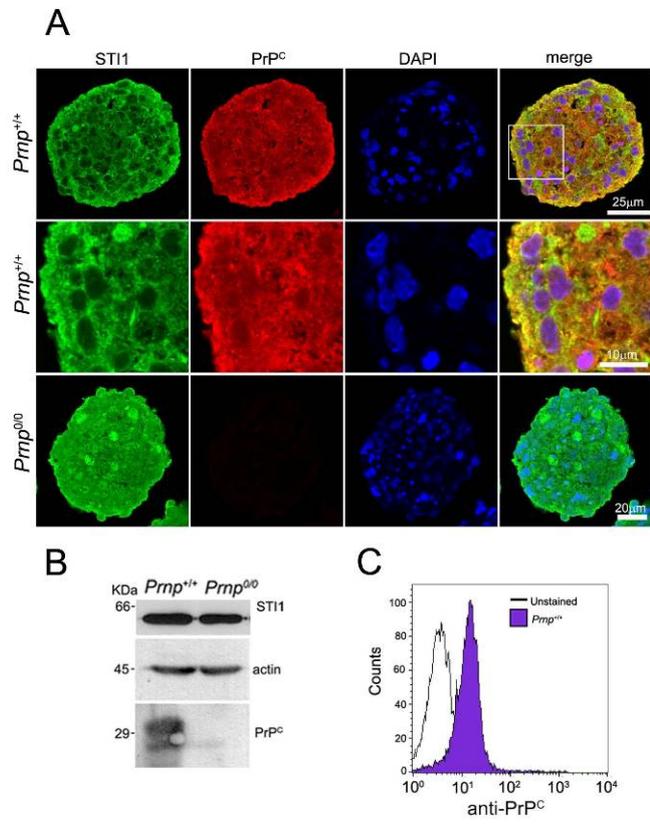


Figure 2

Santos et al

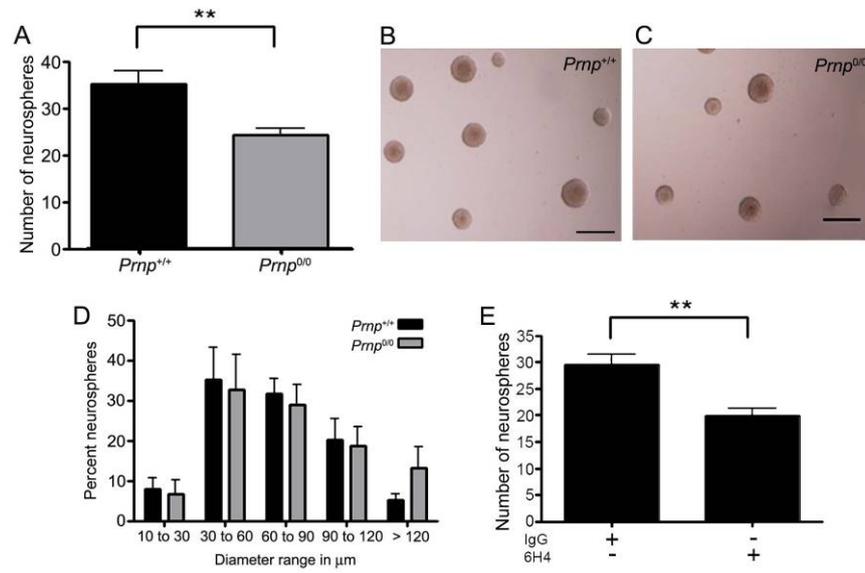


Figure 3

Santos et al

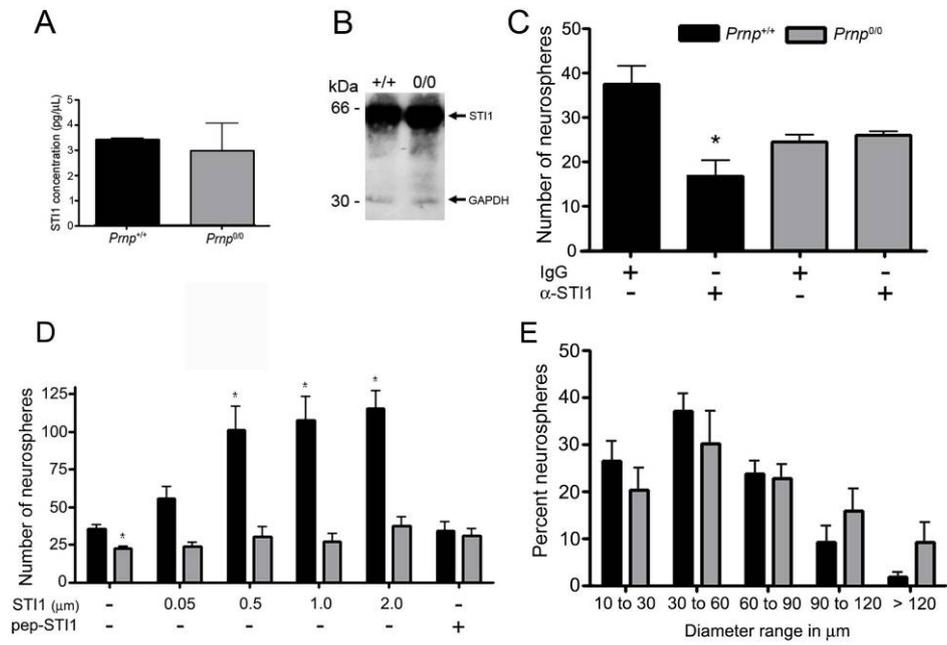


Figure 4

Santos et. al

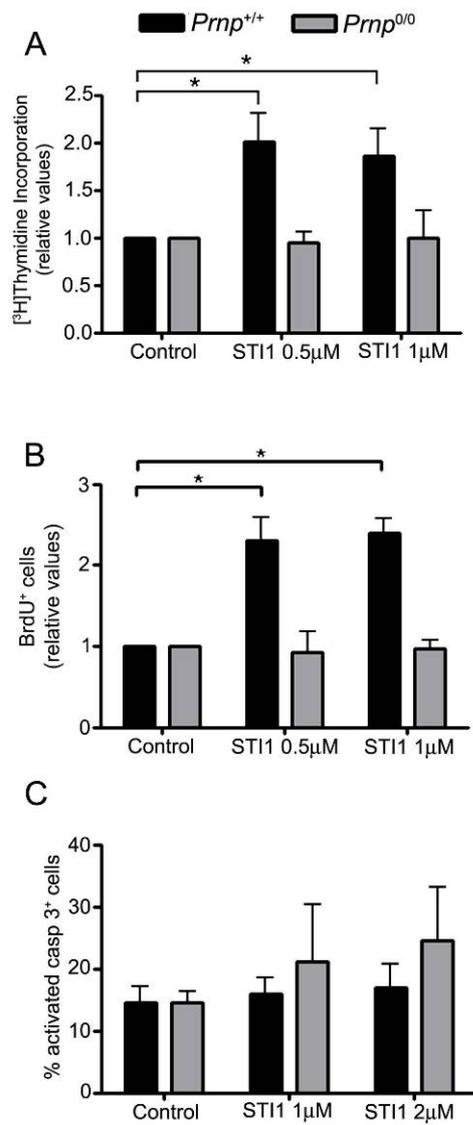


Figure 5

Santos et al

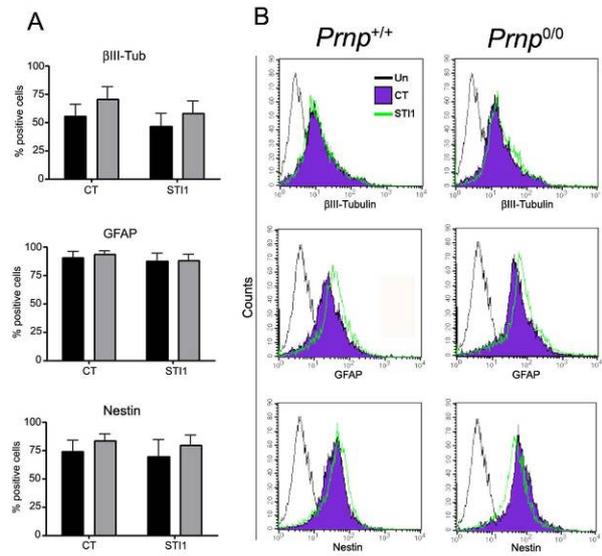


Figure 6

Santos et al.