

**PARTICIPAÇÃO DA INTERAÇÃO PRION CELULAR-LAMININA
NOS PROCESSOS DE ADESÃO, MIGRAÇÃO E COLONIZAÇÃO DE
CÉLULAS TUMORAIS**

FÁTIMA MOUSSA

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADORA: DRA.
VILMA REGINA MARTINS

São Paulo
2001

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa

Hospital do Câncer A.C. Camargo

Moussa, Fátima

Participação da interação prion celular-laminina nos processos de adesão, migração e colonização de células tumorais / Fátima Moussa. -- São Paulo, 2001.

p.66

Dissertação(mestrado)—Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Vilma Regina Martins.

Descritores: 1. LAMININA/fatores prognóstico. 2. PRION. 3. LAMINA BASAL. 4. MIGRAÇÃO ADESÃO CELULAR. 5. LINHAGEM CÉLULAS TRANSFORMADAS. 6. LINHAGEM CÉLULAS TUMORAIS.

*Dedico esse trabalho aos meus pais Shaaban e Maria e
ao meu querido avô Mário Coluço.*

Obrigada Senhor Deus por dar-me tão grandes coisas.

AGRADECIMENTOS

A Vilma Regina Martins, por conferir-me a oportunidade de crescimento pessoal e profissional e por indiscriminadamente acreditar que todas as coisas são possíveis.

Ao Professor Ricardo Renzo Brentani pela credibilidade e pelos exemplos de otimismo e de constante vontade de aprender e vencer.

Ao Luiz Fernando Lima Reis por todo apoio conferido à minha pessoa e pelo exemplo de trabalho sério e criterioso junto as atividades da pós graduação.

Ao Roger Chammas que conduziu-me com tanta maturidade, paciência e atenção nas pequenas e grandes coisas.

A Dra. Mary Sogayar e Dr. Paulo Lee Ho, pelas sugestões e atenção dispensada na leitura criteriosa dos relatórios.

A minhas amigas Miriam, Rose e Regininha, por tudo (impossível enumerar).

De forma muito especial, a Ana e Márcia (pós-graduação) um gigantesco obrigada pela amizade, paciência, cumplicidade e por dividir comigo todas as coisas.

A todo pessoal administrativo, em especial as Senhoras Anthi, Carla e Lourdes que cuidaram com tanta atenção e carinho de todos os problemas burocráticos (viagens, notas fiscais, material e pela compreensão e amizade).

Ao pessoal de apoio por nunca deixarem faltar nenhum material, por serem prontamente disponíveis e por compartilharem de nossas atividades práticas com tanto interesse e desempenho, em especial ao Chamberleim, Sr.Eudes e Sampaio.

Com muito carinho, a todos meus amigos do Instituto Ludwig, desse Hospital e da Faculdade de Medicina-USP, que apostaram em mim e compartilharam destes preciosos momentos, em especial as *Adrianas (Mercadante e Freitinhas)*, ao *Zeinates*, ao *Edgard*, ao *Drº Orestes*, *Kilzinha*, "*Rose*", "*Ane*", "*Mary*", *Gláucia*, "*Angel-mix*", *Ricardinho*, "*Mi*" e *Priscila*.

Meu muito obrigada.

RESUMO

A proteína prion celular (PrPc) é uma isoforma de uma proteína infecciosa conhecida por seu envolvimento na encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca) e pela possível transmissão para o homem. O mecanismo de propagação da infecção resulta da modificação conformacional da proteína celular pela forma infecciosa, e portanto sem envolvimento de material genético do agente infeccioso. PrPc é expressa em todos os tecidos e sua estrutura primária apresenta uma grande similaridade entre as espécies, o que sugere que PrPc deva cumprir um papel fisiológico importante, o qual ainda está sendo investigado. Nosso grupo caracterizou recentemente a proteína prion celular como um novo ligante de laminina (LN) e que esta interação está envolvida em processos de plasticidade neuronal. A interação de PrPc ocorre num decapeptídeo da região amino-terminal da cadeia γ -1 de LN. Dada a importância da laminina nos processos tumorais e a pouca informação a respeito do papel de PrPc, pareceu-nos bastante relevante avaliar se a interação de PrPc com a LN poderia participar da adesão de linhagens celulares normais, transformadas e metastáticas (NIH3T3, NIH3T3*jun*, NIH3T3*ras*, SKMel, A2058, C6). Avaliamos ainda a participação de PrPc nos processos de migração e colonização *in vitro* utilizando-se de células NIH3T3*ras*. Demostramos que o bloqueio de prion celular na superfície de células normais e tumorais inibe sua adesão à laminina e ao peptídeo da cadeia γ -1 de LN. A especificidade para o evento é mostrada pela ausência de efeito quando fibronectina (FN), que sabidamente não liga PrPc, é usada. Como esperado, anticorpos contra a cadeia integrina β -1 inibem a adesão celular em LN e FN. Curiosamente, estes anticorpos bloqueiam a adesão celular ao peptídeo da cadeia γ -1 de LN, que nunca foi descrito na literatura como ligante de integrinas β -1, sugerindo que a cadeia integrina β -1 está também relacionada, direta ou indiretamente, com este domínio da LN no processo de adesão celular. Culturas primárias de fibroblastos de camundongos normais e de animais que tiveram o gene de PrPc removido (PrPc^{-/-}) foram usadas para que entendêssemos melhor a participação de PrPc na adesão celular à LN. As células derivadas de animais normais tiveram o mesmo comportamento descrito para as linhagens celulares já estudadas.

Entretanto, células derivadas de animais PrPc^{-/-} não aderem ao peptídeo da cadeia γ -1 de LN nem à LN. Células normais e PrPc^{0/0} expressam integrina β -1, aderem em FN e esta adesão é inibida por anticorpos anti integrina β -1, indicando que ambas têm integrinas β -1 funcionais. Portanto especulamos que neste modelo de adesão, a interação PrPc-LN procede ou modula direta ou indiretamente a associação da cadeia integrina β -1 à LN. O bloqueio de PrPc em células NIH3T3^{ras} inibe sua migração tanto para LN como para o peptídeo da cadeia γ -1 de LN em cerca de 85%. Entretanto, este bloqueio não tem nenhum efeito sobre a migração em FN. Ensaios *in vivo* foram conduzidos para avaliar se o bloqueio de prion celular da superfície de células NIH3T3^{ras} poderia impedir sua colonização em pulmões de camundongos das cepas Balb/c e Suíços. Nossos resultados mostram que quando comparados com controles os animais injetados com células onde prion celular é bloqueado apresentam redução de 50% no número de colônias pulmonares. Portanto, nossos resultados sugerem que a interação prion celular-laminina está envolvida nos eventos de adesões, migrações e colonizações pulmonares.

ABSTRACT

Cellular prion protein (PrPc) is a normal cell membrane sialoglycoprotein whose function is under investigation. We have recently observed that PrPc is a saturable, specific, high-affinity receptor for laminin (LN) and its binding site resides in a carboxy-terminal decapeptide (RNIAEIIKDI) from the γ -1 LN chain. Herein we investigated the role of the PrPc-LN interaction in the adhesion of normal, transformed and metastatic cell lines (NIH3T3, NIH3T3*c-jun*, NIH3T3*ras*, SKMel, A2058 and C6). The PrPc participation on tumoral metastatic cell line (NIH3T3*ras*) migration *in vitro* and lung colonization *in vivo* was also investigated. Our data showed that PrPc impairment with specific antibodies blocked cell adhesion to LN or to the decapeptide from the γ -1 LN chain by 80%, no inhibition was observed when fibronectin was used as substratum. As expected, antidodies against β -1 integrin chain were able to block cell adhesion to LN. However, they blocked adhesion to the decapeptide from the γ -1 LN chain, which should not be a binding site for integrins. Primary culture fibroblasts from normal and PrPc deleted mice were used to better understand the PrPc participation on LN cell adhesion. Cells derived from normal mice had the same behavior of the cell lines previously studied. However, PrPc deleted cells did not adhere either on γ -1 LN decapeptide or whole LN. Normal and PrPc deleted cells express β -1 integrin, adhere on fibronectin and this adhesion was inhibited by anti β -1 antibodies, indicating that they have functional β -1 integrins. Therefore we speculated that PrPc interaction with LN, in these experimental conditions was necessary to trigger cell adhesion. PrPc impairment blocked NIH3T3*ras* cell migration through laminin and peptide from the γ -1 LN chain-coated membranes by 85%. However, it did not have any effect on migration to fibronectin. We procedure experiments *in vivo* in an attempt to understand the role of PrPc on NIH3T3*ras* cell lung colony formation. We observed that when PrPc at the cell surface is blocked with specific antibodies the lung colonization decreased by 50%. These findings suggest that PrPc interaction with LN might participates on cell adhesion, migration and invasion.

ABREVIACES E SIGLAS

BSA	Albumina srica bovina
CN	Colgeno
CJD	Disease Creutzfeldt-Jakob
CO ₂	Dixido de carbono (gs carbnico) ou anidrido carbnico
D.O	Absorbância tica
DMEM	Meio de Cultura para linhagens celulares (Dulbecco's Modified Eagle Mdium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	cido Etilenodiaminotetractico
EHS	Rabidomiosarcoma Engelbreth-Holm-Swarm
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FACS	Flow cytometric analysis
FFI	Insonia familiar fatal
FITC	Isotiocianato de fluorescena
FN	Fibronectina
GSS	Disease Gerstmann-Strussler-Scheinker
IgG	Imunoglobulina do tipo G
LN	Laminina-1 murino
MEC	Matriz Extracelular
NEM	N-ethylmaleimide
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio

PBS	Tampão salina-fosfato
PBS-BSA	PBS com 0,5, 1 ou 2% de BSA
PBS-EDTA	PBS com 0,02% EDTA
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoreto de fenol metil sulfonata
PrP ^c	Proteína prion celular
PrP ^{sc}	Isoforma infecciosa da proteína prion celular, denominada prion <i>scrapie</i>
rpm	rotações por minuto
RPMI	Meio de Cultura para linhagens celulares (Roswell Park Memorial Institute)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TSE	transmissible spongiform encephalo/encefalopatia espongiforme
U.V.	Radiação ultra violeta

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 - A Proteína Prion Celular	01
1.2 - A Laminina	05
1.3 - As Integrinas	08
1.4 - A Matriz Extracelular e a Disseminação Tumoral	10
1.5 - A interação PrPc-LN pode estar envolvida na disseminação tumoral?	12
1.6 - Objetivos Específicos	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 - Cultivo Celular	14
2.2 - Linhagens celulares e cultura primária de fibroblastos de camundongos	14
2.3 - Purificação de LN	16
2.4 - Obtenção de FN	17
2.5 - Obtenção de antisoros anti-PrPc e purificação da fração IgG	17
2.6 - Digestão de Imunoglobulina tipo G com pepsina	18
2.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	18
2.8 - Verificação PrPc na superfície linhagens celulares por Citometria de Fluxo	18
2.9 - Marcação Metabólica	19
2.10 - Ensaio de Adesão	19
2.11 - Ensaio de Migração	20
2.12 - Ensaio de Colonização Pulmonar	21
2.13 - Teste Estatístico	21
3. RESULTADOS	22
4. FIGURAS E TABELAS	28
4.1 - Citometria de Fluxo	29
4.2 - Ensaios de Adesão	31
4.3 - Ensaios de Migração	46
4.4 - Ensaios de Colonização Pulmonar	51
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 - A Proteína prion celular (PrPc)

A degeneração e a deposição de material amilóide no sistema nervoso central são características comuns de um grupo de doenças que atingem tanto o homem (kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob - CJD, doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker - GSS e insônia familiar fatal - FFI) como animais (*scrapie*, encefalopatia espongiforme bovina, encefalopatia transmissível do vison e doença debilitante crônica). Destas, CJDs e FFI são os únicos exemplos conhecidos até o momento de doenças humanas infecciosas e ao mesmo tempo hereditárias. Embora a etiologia deste grupo de doenças tenha permanecido obscura durante muitos anos, sendo atribuída à infecção por vírus ou viróides, sabe-se hoje que elas são causadas pelo acúmulo intracerebral progressivo de uma proteína extremamente insolúvel conhecida como prion (PRUSINER 1998).

A natureza físico-química do agente responsável pelas TSEs tem sido intensamente estudada. A observação de sua total resistência a altas temperaturas, tratamento por agentes desnaturantes como o formaldeído, radiações ultravioleta, e raio X, levaram a proposta de que é composto apenas de proteína sem nenhum ácido nucléico envolvido. Isto o distingue de todos os agentes patogênicos conhecidos até o momento (PRUSINER 1998).

Em meados da década de 80 o agente infeccioso foi purificado do cérebro de pacientes portadores de CJD (PRUSINER et al. 1982; 1983). Este possui as mesmas características descritas por Griffith (1967), citado por WEISSMANN (1994), quanto à resistência a agentes que degradam ácidos nucléicos, o que levou PRUSINER et al. (1982) a designá-lo “proteinaceous infectious particles” ou prions.

Partículas infecciosas purificadas foram utilizadas na produção de anticorpos monoclonais. Curiosamente, estes anticorpos reconheceram uma proteína de 33-35 kDa, presente tanto nos cérebros de animais normais como nos infectados (OESH et al. 1985; BARRY e PRUSINER 1986). A molécula infecciosa é bastante resistente à ação de enzimas celulares denominadas proteases, enquanto que a proteína presente nos cérebros de

animais normais era totalmente degradada, o que permite concluir que existia uma isoforma celular normal da proteína infecciosa.

A proteína expressa constitutivamente no sistema nervoso central é chamada de prion celular (PrP_c), enquanto que a depositada no cérebro dos animais infectados é denominada de prion *scrapie* (PrP_{sc}). Após a digestão de PrP_{sc} com proteinases tem-se uma forma truncada, chamada de PrP 27-30 (OESH et al. 1985).

Foi demonstrado posteriormente que o PrP_c é uma proteína de superfície celular, ligada à face externa da membrana plasmática dos neurônios por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (STAHL et al. 1987).

A purificação do agente infeccioso permitiu o seqüenciamento dos amino ácidos da extremidade amino-terminal da molécula e a dedução e síntese das possíveis combinações de oligonucleotídeos capazes de codificar este fragmento da proteína. Estas foram usadas como sondas na busca do gene codificador da proteína (OESH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985) e mostraram que este é um gene cromossomal e não exógeno. Este fato comprovou que a partícula infecciosa é realmente produto de um gene do hospedeiro, o qual está localizado no braço curto do cromossomo 20 humano e no cromossomo 2 do camundongo (OESH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985). A análise da seqüência nucleotídica do gene de camundongo mostrou que ele é formado por dois exons, separados por um intron com aproximadamente 10 kb. O primeiro exon tem 56-82 pares de bases e o segundo cerca de 2 kb, onde está contida toda a fase aberta de leitura (BASLER et al. 1986). Estes achados, juntamente com o seqüenciamento da extremidade amino-terminal do PrP_c e do PrP_{sc}, mostrando seqüências idênticas de amino ácidos (TURK et al. 1988), sugerem que as diferenças entre o PrP_c e PrP_{sc} são provenientes de modificações pós-traducionais.

PRUSINER (1998) propôs que quando prion era introduzido em células normais, seria capaz de converter moléculas de PrP_c em PrP_{sc} através da formação de dímeros. Segundo este autor, a ligação do PrP_{sc} ao PrP_c poderia impor uma mudança de conformação neste último, transformando-o em outra molécula de PrP_{sc}. Desta forma, de acordo com este modelo, a infecção é produtiva porque novas moléculas de PrP_{sc} são exponencialmente geradas a partir de PrP_c. O acúmulo de PrP_{sc} insolúvel é provavelmente um dos eventos que levam a morte neuronal (MCKINLEY et al. 1987).

A prova definitiva da participação de PrPc no processo infeccioso foi dada quando o grupo de Charles Weissmann (BÜELLER et al. 1993) produziu um camundongo onde o gene que codifica PrPc foi deletado, e por consequência o animal não expressa a proteína celular. Este animal é completamente resistente a infecção por prion o que pode ser revertido se um transgene de PrPc for introduzido.

PrPc é uma proteína extremamente conservada evolutivamente, o que pode sugerir que tenha função celular importante (BÜELLER et al. 1992) entretanto, apesar do conhecimento gerado sobre esta proteína pouco se sabe sobre sua função fisiológica. Estudos neste sentido têm sido alvo de diversos grupos de pesquisa.

Os genes que codificam a proteína prion celular humano, de hamsters, camundongos, ratos, cabras e galinhas já foram sequenciados (KRETZCHMAR et al. 1986; BASLER et al. 1986; LOCHT et al. 1986; LIAO et al. 1987; GOLDMANN et al. 1990; HARRIS et al. 1991). Todos codificam proteínas de aproximadamente 250 amino ácidos, com um peptídeo sinalizador de 22 amino ácidos na extremidade amino-terminal e um peptídeo hidrofóbico de 23 amino ácidos na porção carboxi-terminal, o qual é removido durante a adição de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

A expressão de PrPc parece ser variável durante as várias etapas do desenvolvimento, como demonstrado por vários trabalhos realizados através de hibridização *in situ* (MCKINLEY et al. 1987; MOBLEY et al. 1988; MANSON et al. 1992; HARRIS et al. 1993). No camundongo, o RNA mensageiro da proteína prion (mRNA PrP) pode ser detectado no tubo neural a partir do décimo terceiro dia de vida intra-uterina, aumentando de quantidade após o nascimento. Estes mensageiros são encontrados também nos neurônios do neocórtex, nas células de Purkinje do cerebelo, no hipocampo, na medula espinhal, em gânglios periféricos e nervos, além de neurônios do epitélio olfatório e da retina (KRETZCHMAR et al. 1986; MCKINLEY et al. 1987).

Em hamsters, a concentração do mRNA de PrP parece estar sob a regulação do fator de crescimento neuronal (NGF) (MOBLEY et al. 1988), sugerindo uma possível participação de PrPc no desenvolvimento e diferenciação neuronais. No entanto, o fato de outros tecidos como intestino, rim, lâmina dental e membranas extra-embriônicas também produzirem estes mensageiros pode indicar uma função celular mais ampla (MANSON et al. 1992).

Animais onde o gene de PrPc é deletado têm um desenvolvimento normal (BÜELLER et al. 1992). Entretanto, algumas alterações são notadas como o bloqueio na inibição rápida do receptor GABA_A (ácido γ -aminobutírico tipo A), diminuição na Potenciação de Longo Prazo (LTP) no hipocampo, COLLINGE et al. (1994) e alteração no ritmo circadiano, TOBLER et al. (1996) além de perda de células de Purkinje no cerebelo e progressivos sinais de ataxia levando a morte prematura (SAKAGUCHI et al. 1996).

PrPc parece estar envolvido na ativação de linfócitos mediada por mitógenos, CASHMAN et al. (1990) e com a regulação das concentrações de cálcio intracelular em neurônios (KRISTENSSON et al. 1993).

Recentemente, foi descrito que a extremidade amino-terminal de PrPc pode associar-se com íons cobre (MIURA et al. 1996; BROWN et al. 1997). Animais deletados de PrPc possuem 20 vezes menos cobre no cérebro que animais normais, indicando que a associação é fisiológica. A ligação com cobre é importante para a atividade catalítica de muitas enzimas envolvidas com o estresse oxidativo, incluindo a superóxido dismutase (SOD) (KARLIN e TYEKLAR 1993). Uma vez que células de cerebelo de animais deletados de PrPc são mais sensíveis a radicais livres que células normais, foi sugerido que PrPc possa atuar como um depósito de íons cobre destinados à ligação a enzimas que previnem o estresse oxidativo (BROWN et al. 1997). Entretanto, estudos mais recentes demonstraram, por espectrometria de massa não existir diferenças na quantidade de cobre no cérebro de camundongos que expressam diferentes concentrações de cobre. As atividades de SOD-1 e da citocromo c oxidase em extratos de cérebros desses animais são similares a de animais normais (WAGGONER et al. 2000). Desta forma a atividade de PrPc como carreador de cobre ainda é controversa.

Uma vez que PrPc e PrPsc estão ancorados à superfície das células e portanto sem contato com a face interna da membrana plasmática, sua internalização deve envolver um ligante ou receptor que promove tanto a conexão entre PrPc/PrPsc com o interior da célula como pode participar da conversão de PrPc em PrPsc (HARRIS et al. 1996).

Nosso grupo tem trabalhado na caracterização de proteínas ligantes de PrPc na tentativa de mapear suas funções fisiológicas. Caracterizamos recentemente uma proteína receptora de PrPc presente na superfície de neurônios que liga PrPc tanto *in vivo* como *in vitro*. A bloqueio desta proteína com anticorpos específicos inibe a neurotoxicidade do

peptídeo 106-126 de prion humano sobre culturas primárias de células de hipocampo de rato. Desta forma essa proteína poderia estar envolvida tanto nos processos fisiológicos mediados por PrPc como no mecanismo de infecção desencadeado por prion (MARTINS et al. 1997).

Numa linha de pesquisa paralela nosso grupo mostrou que PrPc é um ligante de alta afinidade à Laminina (LN), o principal componente não colagênico da membrana basal. Esta interação parece ser específica uma vez que PrPc não liga outros componentes da MEC como colágeno (CN) e fibronectina (FN) (GRANER et al. 2000b).

Nossos resultados mostram que a interação PrPc-LN participa intimamente da diferenciação neuronal evidenciada pela promoção do crescimento e manutenção de neuritos, tanto em linhagens celulares estabelecidas quanto em culturas primárias de neurônios de ratos e camundongos (GRANER et al. 2000a,b).

Como já discutido anteriormente, PrPc é uma proteína constituinte de vários tipos celulares e portanto suas funções fisiológicas não devem estar restritas apenas ao processo de plasticidade neuronal. Também a LN presente de diferentes tecidos, esta envolvida com diferentes funções biológicas. Desta forma podemos sugerir que o complexo PrPc-LN possa atuar em outros eventos celulares tanto fisiológicos quanto patológicos.

1.2 - A Laminina (LN)

A LN é a maior glicoproteína presente nas membranas basais que circundam os epitélios, vasos sanguíneos, nervos e as bainhas cerebrais. Ela está presente nos estágios iniciais do desenvolvimento e na fase adulta, sendo sintetizada, secretada e depositada na matriz extracelular (MEC) pelas células (LUCKENBILL-EDDS 1997).

A LN possui aproximadamente 850 kDa sendo formada por um braço longo denominado de cadeia α (~400kDa) e outros dois menores denominados de cadeias β e γ (~220kDa cada), o que lembra o formato de uma cruz. As três cadeias estão unidas por pontes de dissulfeto e por pontes não covalentes (LUCKENBILL-EDDS 1997).

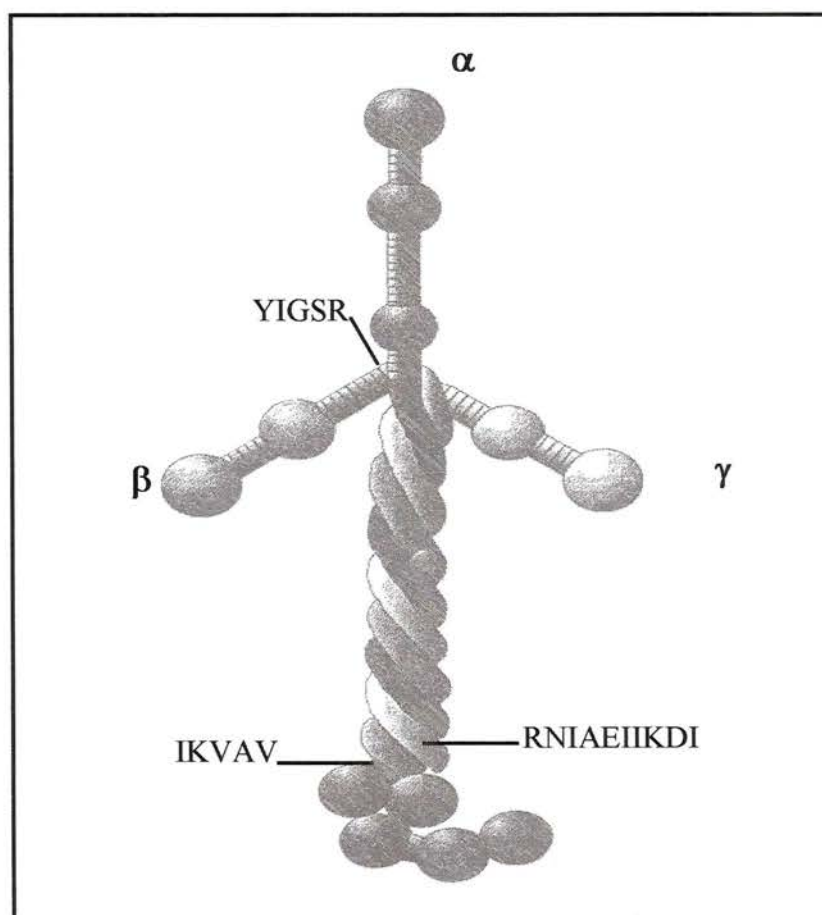
As regiões carboxi-terminais das cadeias β e γ unem-se a cadeia α e conferindo à LN uma estrutura em forma de tripla hélice (LUCKENBILL-EDDS 1997). O braço longo

ou cadeia α é composto por cinco subdomínios globulares formados na porção carboxi-terminal (esquema 1) (BECK et al. 1990). Os braços curtos (β e γ), são derivados da região amino-terminal destas cadeias separadamente, onde cada uma delas é organizada de forma alternada de domínios ricos e pobres de cisteína. Essa composição pode sofrer variações de acordo com o tecido e com sua funcionalidade (LUCKENBILL-EDDS 1997).

A obtenção de LN (tipo 1) para esse estudo tem sido conseguida através do tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), de onde é purificada por precipitações com alto teor salino e filtrações cromatográficas (PAULLSON et al. 1987). A LN também pode ser extraída de outras fontes como placenta e células de origem endodérmica que podem ser mantidas em culturas *in vitro* (TIMPL e BROW 1994). Novas isoformas das cadeias α , β e γ estão sendo descritas por ENGVALL e RUOSLAHTI (1997), e as combinações destas produzem 11 tipos de LN conhecidas até hoje LUCKENBILL-EDDS (1997), todas elas arrançadas em estruturas cruciformes, semelhantes à LN-1.

A LN também pode interagir com outras moléculas da MEC como o CN tipo IV além de ligar-se à proteínas na superfície celular (CHEN et al. 2000). Essa associação resulta em inúmeros fenômenos biológicos com adesão, migração, embriogênese, fenômenos imunológicos e hematológicos e no desenvolvimento de neuritos (VON DE MARK e JUL 1985).

A LN possui vários ligantes na superfície celular que são divididos em dois grandes grupos: receptores tipo integrinas e as proteínas ligantes tipo "não integrinas". O receptor de 68 kDa que reconhece a seqüência YIGSR na cadeia β -1 da LN foi caracterizado nas membranas de músculo esquelético e em outros tipos celulares incluindo neurônios e é capaz de promover a adesão e migração celulares, mas não o crescimento de neuritos (TAYLOR et al. 1998). Também a proteína de 110 kDa que reconhece o domínio IKVAV, no braço longo da cadeia α 1 da LN e medeia o crescimento de neuritos (LUCKENBILL-EDDS 1997). Outra proteína de particular interesse capaz de interagir especificamente com a LN é a proteína prion celular, que se liga no braço longo da cadeia γ 1 da LN na seqüência RNIAEIIKD, sendo capaz de promover a adesão de neurônios e o crescimento e a manutenção de neuritos (GRANER et al. 2000a). Os domínios de interação dos receptores não integrinas de LN estão mostrados no esquema 1.

Esquema 1

Modificado de YURCHENCO e O'REAR, Curr. Opinion in Cell Biology, 1994.

Esquema 1 - Representação esquemática da LN.

1.3 - As Integrinas

As integrinas são proteínas presentes nas superfícies celulares que se conectam à MEC. Estas foram descobertas na década de 80, através de ensaios que bloquearam a adesão celular aos componentes ligantes presentes na MEC (DEDHAR e HANNINGAR 1996).

Elas são formadas por duas cadeias α e β que quando associadas, formam um heterodímero transmembrânico com domínio C-terminal intra citoplasmático e um domínio N-terminal extracelular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI 1999). Quando submetidas a eletroforese não redutora, separam-se nas frações de 95 e 130 kDa (β) e 130-210 kDa (α) (GINSBERG et al. 1988). Sabe-se da existência de 16 diferentes cadeias α e 8 cadeias β já foram descritas (SPRINGER 1990). A associação destas subunidades em heterodímeros forma ligantes para proteínas da MEC. Alguns deles são específicos para uma única proteína e outros podem ligar mais que um componente da MEC (quadro 1).

Dentre os membros da família β das integrinas, podemos detectar que a subunidade $\beta 1$ medeia a interação das células à MEC, a subfamília $\beta 2$ é restrita a leucócitos e a família $\beta 3$ é composta por duas integrinas conhecidas como $\alpha IIb\beta 3$ (denominada anteriormente de $gpIIb/IIIa$) que é expressa em megariócitos um importante mediador de adesão plaquetária durante a trombose, PASQUALINI et al. (1989) e a integrina $\alpha v\beta 3$ que associa células à vitronectina (BROOKS et al. 1994).

A interação mais comum das integrinas nos mecanismos de adesão é efetuada pelo reconhecimento do tripeptídeo RGD nas proteínas da MEC como FN, CN e Vitronectina. Entretanto a interação das integrinas à LN não envolve a região RGD, estando esta mapeada em vários peptídeos das cadeias α e β (GEHLSSEN et al. 1988). Devido a sua localização transmembrânica as cadeias β das integrinas podem interagir diretamente com elementos do citoesqueleto como os microfilamentos, filamentos intermediários e o complexo de hemidesmossomos. Esse arranjo entre a MEC e o citoesqueleto gera um complexo sistema de transdução de sinais que altera a organização do citoesqueleto, a morfologia e a motilidade celulares (QUARANTA e JONES 1991).

As células que perdem a expressão de integrinas entram em apoptose pela falta dos sinais gerados do meio extra para o intracelular. As perturbações da atividade das integrinas

contribuem para muitos processos patológicos e para progressão tumoral (LUKASHEV et al. 1998).

No quadro abaixo, estão relacionadas as associações das subunidades α e β que compõem os diferentes receptores de proteínas da MEC.

Quadro 1

Cadeias das integrinas	Ligantes	Cadeias das integrinas	Ligantes
β_1	α_1 (LN, CN)		
	α_2 (CN, LN)		
	α_3 (LN, CN, FN, Epi)		
	α_4 (FN*, VCAM-1)	β_7	(MAdCAM-1)
	α_5 (FN)		
	α_6 (LN)	β_4	(LN)
	α_7 (LN?)		
	α_8 ?		
	α_V	β_5	(VN)
		β_6	(VN)
β_2		β_8	(?)
	α_L (ICAM-1, ICAM-2)		
	α_M (ICAM-1, iC3b, FB)		
	α_X (iC3b)		
β_3	α_V (FN, VN, FB, VWF, TSP)		
	β_{IIIb} (FN, VN, FB, VWF, TSP)		

Modificado de BUCK 1995.

Quadro 1 – Esquema resumido da especificidade de ligação das integrinas. iC3b= fragmento que se liga ao complemento; FB= fibrinogenio; LN= Laminina; FN= fibronectina; FN*= domínio que se liga a célula; CN= colágeno; Epi= epiligrina; MadCAM-1= adressina mucosal; VN= vinculina; VWF= fator de von Willebrand; TSP= trombospodina.

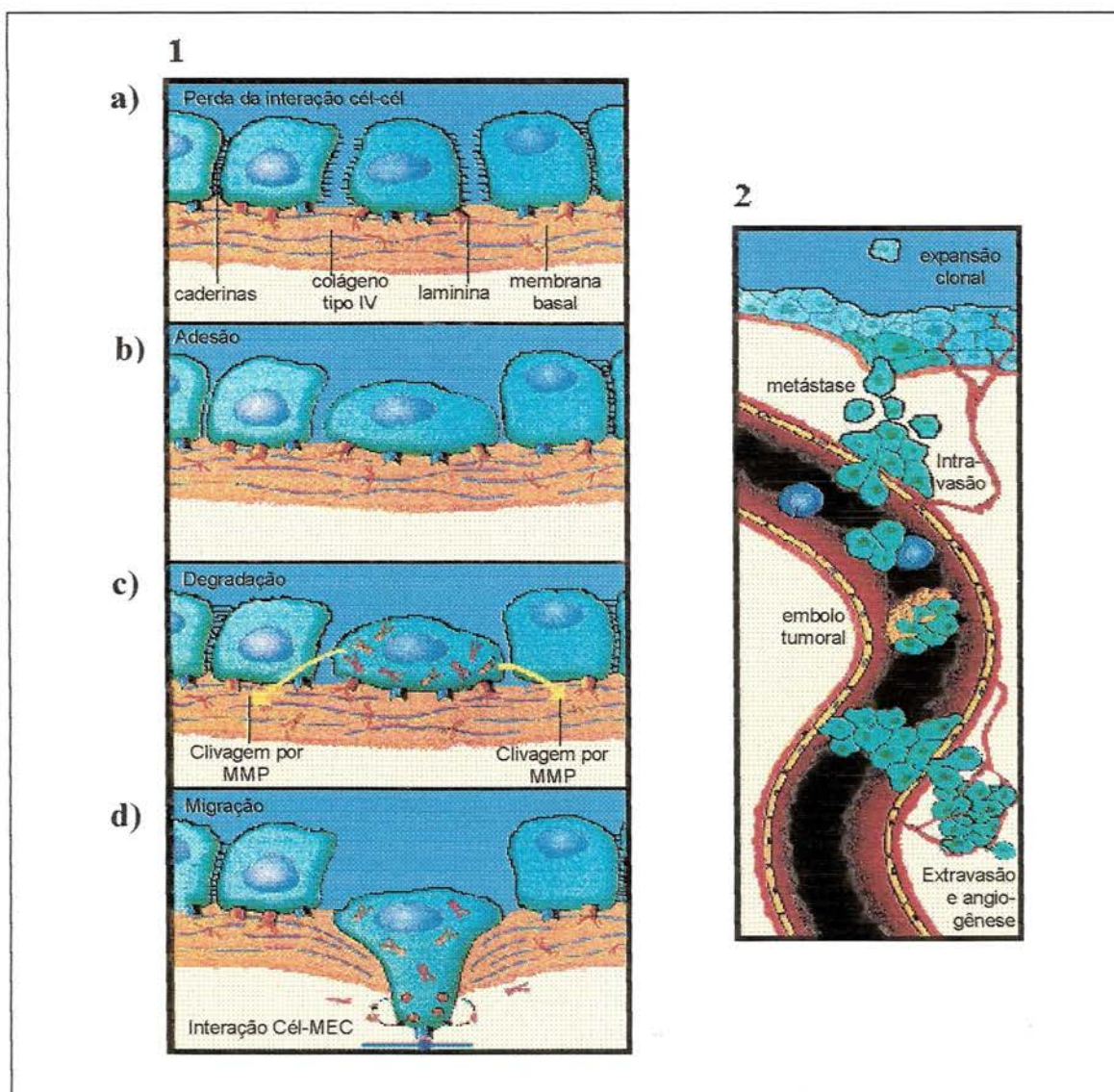
1.4 - A Matriz Extracelular e a Disseminação Tumoral

A MEC é uma malha composta de macromoléculas capaz de regular as funções celulares, como a diferenciação e a expressão de genes específicos para cada tecido. Ela pode agir influenciando positiva ou negativamente a diferenciação celular, dependendo do tipo de célula e do tecido (LIN et al. 1993). A regulação da MEC pode ser orquestrada por fatores de crescimento e por hormônios (LUKASHEV et al. 1998).

As interações entre as células e a MEC podem ser total ou parcialmente alteradas nas neoplasias o que pode influenciar a proliferação e a invasão tumorais (DEDHAR e HANNINGAR 1996). Durante a transição do carcinoma invasivo *in situ*, as células tumorais penetram na membrana basal e atravessam o estroma, ganhando acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos e então disseminam-se. Há três passos bem caracterizados nas células tumorais que estão envolvidos com a cascata metastática: 1- Perda da interação célula-célula, que é efetuada principalmente pelas caderinas, onde os receptores específicos vão ligar-se aos componentes da MEC, como a LN e FN; 2- Degradação da MEC pelas células tumorais pela ativação de metaloproteinases, associada com a invasão onde a principal característica é a desorganização e fragmentação dos elementos do estroma e da membrana basal e 3- Síntese dos componentes de matriz pelas células tumorais que se locomovem para outros órgãos após terem viajado pelos vasos (Esquema 2). A continuidade da invasão necessita de ciclos repetidos dos passos descritos acima (STOSSEL 1993; MAÑES et al. 2000).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para investigar a interação entre receptores da superfície celular com a LN, como por exemplo a cromatografia de afinidade (GEHLSSEN et al. 1988) e o bloqueio de receptores ou ligantes pelo uso de anticorpos específicos (SANCHES-MADRID et al. 1983). Os principais receptores celulares que se ligam à LN mediando a adesão, são as integrinas que reconhecem especificamente determinadas seqüências peptídicas (LUCKENBILL-EDDS 1997). Diferentes receptores de LN já foram descritos e esses podem ter graus de ocupação diferentes nos carcinomas, fato que pode estar diretamente relacionado com a organização das membranas basais dos próprios carcinomas (LIOTTA 1990).

Esquema 2



Modificado de Robbins, Pathologic Basis of Disease, 1999.

Esquema 2 – Representação esquemática da disseminação tumoral. 1 - A) Perda da interação célula-célula; B) interação dos receptores celulares à Lamina Basal; C) Ativação da expressão de metaloproteinases (MMP); D) Migração. 2 - Visão macroscópica da disseminação tumoral, onde as células viajam através da via hematogênica ou linfática agregadas a plaquetas.

1.5 -A interação PrPc-LN pode estar envolvida na disseminação tumoral?

Os processos de adesões e migrações celulares são essenciais para a disseminação e para a invasão da matriz extracelular no processo metastático. Este é em geral regulado por interações específicas entre componentes da matriz extracelular, em particular LN, com receptores específicos da superfície da célula como integrinas e proteínas não relacionadas a integrinas (LUCKENBILL-EDDS 1997).

Entretanto, apesar da extensa literatura a respeito do processo de invasão celular muitos pontos ainda são obscuros, isto pode em parte ser dado pelo desconhecimento de todas as interações moleculares e celulares que participam deste complexo sistema.

Resultados do nosso grupo mostrando que PrPc interage com LN mediando os processos de plasticidade neuronal (GRANER et al. 2000a, b), levantou a questão sobre quais outros eventos celulares esta interação seria relevante. E dada a importância da LN nos processos tumorais já discutida aqui e a pouca informação a respeito do papel de PrPc, pareceu-nos bastante relevante estabelecer se a interação de PrPc-LN poderia interferir nos eventos de adesão, migração e colonização pulmonar.

Na tentativa de compreender as respostas biológicas da associação PrPc-LN, utilizamo-nos de células epidermóides imortalizadas ou transformados com os oncogenes *c-jun* e *H-ras* ativado (NIH3T3, NIH3T3*c-jun*, NIH3T3*ras*, respectivamente). Linhagens celulares de melanoma humano (A2058 e SK-Mel-25) e de glioma de rato (C6) também foram utilizadas, além de culturas primárias de fibroblastos provenientes de camundongos selvagens (PrPc^{+/+}) e que tiveram o gene do PrPc removido (PrPc^{-/-}). PrPc foi bloqueado pelo uso de anticorpos específicos e a adesão e migração celulares foram avaliadas sobre diferentes substratos. A capacidade de colonização pulmonar das células NIH3T3*ras* onde PrPc foi bloqueado também foi avaliada.

1.6. – Objetivos específicos:

- I) Quantificar PrPc em todas as linhagens celulares estudadas por citometria de Fluxo;
- II) Avaliar a capacidade de adesão das células, frente aos substratos LN e FN, com ou sem tratamento com os anticorpos anti-PrPc e anti integrina β -1;
- III) Avaliar a capacidade de migração das células, frente aos substratos LN e FN, com ou sem tratamento com os anticorpos anti-PrPc e anti integrina β -1;
- IV) Avaliar a capacidade de colonização pulmonar de células tumorais com ou sem tratamento com os anticorpos anti-PrPc e anti integrina β -1;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Cultivo Celular:

Cada linhagem celular foi cultivada em meio de cultura apropriado, DMEM ou RPMI (GIBCO BRL/LIFE Technology), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB) e mantidas em estufa de atmosfera constante de 5% de CO₂ a 37°C.

As células foram utilizadas para os ensaios específicos quando atingiam confluência de cerca de 70% nas garrafas onde eram mantidas (CORNING 162cm²), quando então eram desprendidas das mesmas com auxílio de tripsina 0,2%, adquirida do Instituto Adolfo Lutz.

A seguir, as células foram centrifugadas a 800 rpm, o sobrenadante desprezado, as células ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SFB e levadas de volta à estufa de CO₂ em tubo (FALCON) contendo 2 ml de meio de cultura acrescido de SFB por 1 hora.

Após o procedimento descrito acima, as células foram utilizadas para realização dos ensaios específicos.

2.2 – Linhagens Celulares e Culturas Primárias de Fibroblastos de camundongos:

As linhagens celulares utilizadas nesse trabalho foram adquiridas do Banco do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e sua procedência esta relacionada na tabela 1.

Para as culturas primárias de fibroblastos foram utilizadas células de embriões de camundongos selvagens e deletados do gene de PrPc (PrPc^{-/-}) gentilmente cedidos pelo Dr. Charles Weissman (Imperial College School of Medicine, London) (BÜELLER et al. 1992).

Fibroblastos de animais normais/selvagens ou deletados do gene de PrPc (PrPc^{-/-}) foram obtidos de embriões entre 12/13 dias. Os embriões foram extraídos assepticamente em fluxo laminar e dissecados, onde tiveram seus membros inferiores, superiores, cauda, cabeça e vísceras extraídos. Os pequenos pedaços do tronco dos embriões foram picados com auxílio de tesoura cirúrgica e colocados em tubo FALCON acrescido de 3ml de

tripsina (volume aproximado para cada 8 embriões) e levados a banho-maria 37°C por 30 minutos.

Em seguida as células foram centrifugadas a 800 rpm e ressuspensas em DMEM acrescido de 10% de SFB, colocadas em garrafas de cultura e levadas à estufa de CO₂ por no mínimo dois dias.

Tabela-1

CÉLULAS	ORIGEM	MEIO CULTURA
NIH 3T3	Fibroblastos imortalizados de camundongos Suiços (ATCC)	DMEM + 10% SFB
NIH3T3 _{ras}	Fibroblastos de camundongos Suiços estavelmente transfectados com oncogene H- <i>ras</i> ativado Cedida pelo Dr. Bernard Groner.	DMEM + 10% SFB
NIH3T3 _{c-jun}	Fibroblastos de camundongos suiços transfectados com oncogene <i>c-jun</i> (CABRAL et al. 2001)	DMEM + 10% SFB
A2058	Melanoma Humano (ATCC)	DMEM + 10% SFB
SK Mel 25	Melanoma Humano (ATCC)	RPMI + 10% SFB
C6	Glioma rato (ATCC). Cedida pela Dra. Mari Sogayar	DMEM + 10% SFB

2.3 – Purificação de LN:

A LN utilizada nos experimentos foi purificada a partir de tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), de origem intramuscular de camundongos C57-BL10. O protocolo adotado para purificação foi descrito por PAULLSON et al. (1987).

Cerca de 60g do tumor foram dissociados mecanicamente com uma lâmina e homogeneizados por 1 minuto com 1,2 L de tampão TBS-PI (0,15M NaCl, 50mM de Tris pH 7,4, 2mM de NEM, 0,5mM PMSF), num liquidificador. A seguir o homogenato foi dividido igualmente em tubos e centrifugados a 10.000g por 20 minutos, rotor GS3 (SORVALL).

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 200ml de tampão TBS-PI para extração.

Um novo ciclo de centrifugação foi realizado, o precipitado combinado e transferidos para 2 tubos de centrífuga, onde em cada tubo foram adicionado 150ml de tampão TBS/EDTA-PI (tampão TBS-PI, 10mM EDTA) e as proteínas extraídas por 1 minuto com auxílio de agitador magnético. Após centrifugação o sobrenadante foi recuperado e denominado EDTA 1. O precipitado foi novamente submetido a uma nova extração e o sobrenadante chamado de EDTA 2.

O precipitado resultante pode ser congelado em nitrogênio líquido de onde se pode extrair outras proteínas da matriz extracelular.

Os sobrenadantes denominados EDTA 1 e EDTA 2 foram combinados e aplicados à uma coluna de sepharose CL6B (PHARMACIA). Várias frações foram coletadas e a presença de proteínas foi evidenciada pela absorbância a 280nm, no eluato.

As frações com maiores absorbâncias (primeiro pico), foram combinadas e diluídas em 50% do volume original com tampão Tris-HCl-PI (50nM Tris pH 7,4, 2,5mM EDTA, 2mM NEM e 0,5mM PMSF) e, aplicadas em coluna de DEAE-Sephacel, previamente equilibradas com tampão Tris-HCl-PI. Essa aplicação foi feita em sistema fechado por aproximadamente 16 h. A seguir, a coluna foi lavada com 200ml de tampão Tris-HCl-PI e a LN eluída em gradiente de 0 – 0,8M de NaCl em fluxo de aproximadamente 4ml/min. As frações foram monitoradas como descrito acima e aquelas correspondentes a LN foram

combinadas e dialisadas por 16h contra TBS (0,15M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4). A concentração proteica foi medida pelo método de BRADFORD (1976).

As frações de LN purificadas foram aliquotadas e armazenadas a -80°C , sendo descongeladas gradativamente antes da realização dos experimentos de interesse.

A concentração de LN utilizada nos experimentos de adesão e migração foi de $10\mu\text{g/ml}$, conforme já havia sido padronizada em experimentos anteriores do laboratório (GRANER et al. 2000 a, b).

2.4 – Obtenção de FN:

A FN purificada a partir de soro humano segundo protocolo já publicado por ENGVALL e RUOSLAHTI (1997) foi cedida pelo Dr. Silvio Sanches Veiga, da Universidade Federal do Paraná.

2.5 - Obtenção de antisoros policlonais anti PrPc e purificação da fração IgG.

Anticorpos contra proteína prion celular, foram obtidos através de imunizações com $10\mu\text{g}/150\mu\text{l}$ PBS pH=7,4 utilizando-se as proteínas recombinantes PrPc-His ou PrPc-GST. A cada 21 dias essas proteínas foram injetadas intraperitonealmente em camundongos PrPc 0/0 ou coelhos respectivamente (GRANER et al. 2000a,b). Após a terceira imunização os animais foram sangrados via veia plexo-orbital ou por veia da orelha. Os soros foram retirados após retração do coágulo e estocados a 4°C . A atividade destes soros foi avaliada por citometria de fluxo. Soro anti GST foi produzido em coelho como descrito acima para anti GST-PrPc.

Na obtenção da fração IgG do soro anti-PrPc, do soro irrelevante anti GST ou soro não imune, estes foram diluídos 1:4 em PBS e adsorvidos em coluna de proteína A Sepharose CL-4B (SIGMA) por um período de aproximadamente 14h a 4°C . Após o acoplamento, a IgG foi eluída da coluna com uma solução de Glicina 0,1M, NaCl 0,15M, pH3 em frações de 1ml em tubos “eppendorfs” já contendo tampão Tris 1M pH8. A concentração proteica da IgG foi determinada pelo método de BRADFORD (1976).

2.6 - Digestão da Imunoglobulina tipo G com pepsina:

A digestão da Imunoglobulina tipo G foi realizada com pepsina (SIGMA Chemical Company) em tampão citrato de sódio 100mM pH 3,5, na proporção de 5:1 (massa) a 37°C por 4h (HARLOW e LANE 1988). Foi realizada uma cinética de digestão que mostrou a digestão máxima em 4 horas de tratamento. A reação foi interrompida pelo acréscimo de 1/10 do volume de Tris 3M pH 8.8. Para confirmação da digestão, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% em condições não desnaturantes, onde se evidenciou a presença das frações IgG 150 kDa e das frações F(ab)₂ (110kDa). No material usado nos experimentos não se observou a banda equivalente a IgG íntegra (150 kDa). Apesar disso, o material digerido foi incubado novamente com proteína A Sepharose, onde a porção Fc proveniente da digestão ou IgG não digerida permaneciam ligadas à resina. Os fragmentos F(ab)₂ foram eluídos em frações da coluna e dosados pelo método de BRADFORD (1976).

2.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio:

Gel de poliacrilamida contendo 10% da mistura de acrilamida 200:1 (199 partes de acrilamida para 1 parte de N,N'-metilenebisacrilamida); 375 mM tris base (pH 8,8); 0,1% SDS; 0,1% persulfato de amônio; 0,04% TEMED. A solução protéica de interesse foi acrescida de tampão de amostra não desnaturante (Tris 0,02M, glicina 0,2M, SDS 10%, traços de azul de bromofenol, 12ml de H₂O), aplicada ao gel e submetida à corrente constante de 40mA, como descrito por (LAEMMLI 1970).

2.8 - Verificação de PrPc na superfície das linhagens celulares por Citometria de Fluxo:

A presença da proteína PrPc na superfície das células foi verificada através da técnica de citometria de fluxo, no equipamento FACScan – Becton Dickinson.

O ensaio foi realizado quando as células mantidas em garrafas de 162 cm² atingiam cerca de 80% confluência. As células foram então lavadas 1 vez com solução de PBS (8mM Na₂HPO₄; 2,7mM KCl; 1,4 mM KH₂PO₄; 0,137 M NaCl) e soltas das garrafas com

solução de PBS/0,5mM EDTA pH 7,4. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, de forma a obter-se 10^6 células/tubo. Aliquotas contendo 10^6 células, foram incubadas com o soro anti-PrPc (produzido em camundongo) ou com soro irrelevante na diluição de 1:100 em PBS, 5%BSA, por 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3 vezes com 1ml de PBS pH 7,4 e a seguir incubadas com Ig de cabra anti-IgG de camundongo, marcado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) na diluição de 1:80 por 30 minutos à temperatura ambiente e novamente lavadas por 3 vezes. As amostras de células foram ressuspensas em 500µl de solução de PBS e a leitura da fluorescência realizada no FACScan, onde foram contadas 10^4 células/amostras. A análise foi realizada no software LYSYS II.

2.9- Marcação Metabólica:

2×10^6 células foram semeadas em placas de cultura de 60cm² (COSTAR) contendo 5ml de DMEM desprovido de metionina - DMEM modificado (SIGMA), acrescido de 10% de SFB dializado (contra PBS pH 7,4) mais 3µCi de [³⁵S] Metionina (AMERSHAM INTERNATIONAL). As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 15h.

A medida de incorporação da [³⁵S] Metionina foi feita pela contagem da radioatividade em cintilador-β (BECKMAM Inst.). A viabilidade celular após a incorporação de [³⁵S] Metionina avaliada por coloração com azul de tripan.

2.10 – Ensaio de Adesão:

Os ensaios de adesão foram realizados com células marcadas metabolicamente, como descrito no item 9.

3×10^4 células foram incubadas com meio de cultura (controle), soro irrelevante de coelho, soro anti GST, soro anti GST-PrPc soro anti cadeia β-1 de integrina (produzido contra a cadeia β1 de integrina humana purificada de placenta Chemicon), IgG purificada de soro anti-GST ou IgG purificada de soro anti GST-PrPc. A incubação foi realizada em 100µl de solução de PBS/ 0,5% BSA, por 30 minutos à temperatura ambiente com os

anticorpos nas diluições especificadas no item resultados. As células foram então semeadas em microplacas de 24 poços (COSTAR) previamente adsorvidas com LN (10 µg/ml), FN (10µg/ml), peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de LN (RNIAEIIKDI, Neosystems) (0.2 µg/ml), peptídeo irrelevante (IRANIEIKI, Neosystems) (0.2 µg/ml). Os peptídeos usados neste experimento estavam covalentemente ligados a BSA. A seguir todos os poços foram bloqueados com BSA.

A adesão das células aos diferentes substratos foi medida após incubação por 1 hora em estufa contendo 5% de injeção de CO₂ a 37° C. Células não aderidas foram removidas das microplacas com 2 ou 3 lavagens com solução de PBS pH 7,4 a 37° C. O controle do número de lavagens usado foi padrozinado para cada linhagem celular.

As células aderidas à microplaca, foram lisadas com solução de SDS 1% por 1h a 37° C e o volume total do lisado foi acrescido de 5ml de líquido de cintilação miscível (FUNDAÇÃO SARDI) e a contagem (cpm) realizada em cintilador β (BECKMAM Inst.).

As contagens (cpm) obtidas em cada experimento a partir da adesão das células sem tratamento sobre LN, foram consideradas 100% e os demais valores foram expressos em valores relativos ao da LN.

2.11 – Ensaio de Migração:

Os ensaios de migração foram realizadas com células previamente marcadas metabolicamente e tratadas com os diferentes anticorpos como descrito nos itens 9 e 10. Estas foram semeadas (2×10^5 células/poço) em microplacas de Transwell - membrana de polycarbonato com poros de 8µm (COSTAR).

LN e FN (10µg/ml) e peptídeos $\gamma 1$ e "scrambled"/ irrelevante (0,2µg/ml) foram adsorvidos nas câmaras de Boyden por aproximadamente 16h a 4° C para realização dos ensaios de migração.

Após o período de incubação com os anticorpos de interesse, as células foram semeadas nos insertos das microplacas de Transwell e levadas à estufa de CO₂ por um período de 5h. Após esse período, os insertos foram fixados com paraformaldeído 3,5% por 15 minutos e corados com 0,5% de azul de toluidina/1% de Bórax por 5 minutos.

Os insertos tiveram a parte superior limpa com auxílio de cotonetes para eliminar as células que não migraram e as células da parte inferior dos insertos foram lisadas com SDS 1% por 1h a 37° C.

O volume total do lisado foi colocado em tubos de cintilação acrescido de 5ml de líquido de cintilação miscível (FUNDAÇÃO SARDI) e a contagem da radioatividade realizada em cintilador β (BECKMAM Inst.).

Da mesma forma que para os ensaios de adesão, as contagens (cpm) obtidas em cada experimento a partir da migração para LN das células sem tratamento foram considerados 100% e os demais valores foram expressos em valores relativos ao da LN.

2.12 – Ensaio de colonização pulmonar

10^6 células NIH3T3 ras cultivadas como descrito no item 1 e incubadas em PBS/0,5% de BSA pH7,4 estéril por 1h a 4° C sem e com adição de IgGs íntegras ou de seus fragmentos F(ab) $_2$ purificados a partir de soro irrelevante de camundongo, soro anti PrPc-His (produzido em camundongo), soro anti GST ou anti GST-PrPc (produzidos em coelho) na concentração de 0,1 μ g/ μ l.

Depois do período de incubação as células foram lavadas 3 vezes com PBS pH=7,4 estéril (1ml/cada), ressuspensas em 200 μ l de PBS/1mM EDTA e, imediatamente injetadas na veia caudal de camundongos Balb/c ou Suiços com cerca de 2 meses.

Os animais foram sacrificados após 15 dias e as colônias formadas nos pulmões foram contadas a olho nú.

2.13 – Teste Estatístico:

Os resultados dos ensaios de adesão, migração e tumorigenese foram avaliados estatisticamente segundo o teste t Student, para amostras independentes. Foram considerados estatisticamente significativos os valores onde $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Dados anteriores do nosso grupo mostram a descrição de um novo ligante de LN, a proteína prion celular e a importância desta associação nos mecanismos de adesão e diferenciação de células neuronais (GRANER et al. 2000a,b). Neste trabalho buscamos entender a relevância dessa associação em estudos clássicos que envolvam os processos de adesão, migração e colonização de células tumorais.

A presença da proteína PrPc na superfície da célula é necessária para que ela possa interagir com a LN. Portanto, nosso primeiro enfoque experimental foi avaliar a expressão de PrPc na superfície das linhagens celulares eleitas para nosso estudo usando a técnica de citometria de fluxo a partir de células não permeabilizadas.

As células da linhagem NIH3T3 foram escolhidas pois possuímos clones destas transfectados com c-jun (NIH3T3c-jun) ou com H-ras ativado (NIH3T3ras). Além disso escolhemos duas linhagens humanas de melanoma com um alto poder metastático (A2058 e SK Mel-25) e também uma linhagem de glioma de rato, C6.

A Figura 1 mostra curvas representativas da expressão de PrPc em cada linhagem celular. As médias e os desvios padrões dos valores de fluorescência específica são apresentadas na Tabela 2. Os resultados mostram que a expressão de PrPc na superfície das linhagens analisadas é bastante similar.

Iniciamos então a padronização dos ensaios de adesão titulando os soros que seriam usados nos ensaios. A figura 2 apresenta a atividade do soro anti GST-PrPc na inibição da adesão de células NIH3T3ras sobre LN, mostrando que na diluição 1:100 o soro anti GST-PrPc atinge sua atividade máxima. Como este soro foi gerado utilizando-se a proteína recombinante de fusão GST-PrPc usamos como controle um soro anti a porção GST da molécula. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com linhagem neuronal em trabalho já publicado do nosso grupo (GRANER et al. 2000b). As IgG destes soros foram purificadas e a titulação de sua atividade no reconhecimento de PrPc mostra que na concentração de 3µg/100µl sua atividade inibitória é máxima (Figura 3). Além disso podemos observar que a inibição da adesão celular à LN mediada pelo anticorpo anti GST-PrPc não é um evento inespecífico produzido por este soro. Um anticorpo monoclonal comercial (monoclonal Ab6H4, Prionics Co) e dois outros policlonais produzidos a partir

de imunização dos coelhos denominados 35 e 36 com PrPc recombinante com cauda de histidina (6His-PrPc) também têm atividade inibitória sobre a adesão (Figura 4).

Anticorpo anti integrina β -1 foi usado como controle positivo dos nossos experimentos. A cadeia integrina β -1 pode associar-se à diferentes cadeias α , o complexo tem especificidade para diferentes substratos, sendo que o heterodímero formado possui afinidade específica variada frente a diferentes substratos. A vantagem de seu uso como controle é que integrinas com cadeia integrina β 1 podem ligar laminina ou fibronectina (KUMAR 1998), sendo que a última não é um ligante de PrPc (GRANER et al 2000a e b). A Figura 5 mostra a titulação do soro anti β -1 (anti a cadeia integrina β -1 humana, Chemicon) que na diluição 1:100 atinge sua atividade máxima na inibição da adesão celular à LN.

As figuras 2, 3, 4 e 5 mostram que o bloqueio de PrPc ou integrina β -1 com anticorpos anti-PrPc, IgG anti-PrPc ou anti integrina β -1 inibe a adesão de células NIH3T3*ras* à LN em cerca de 80%.

Decidimos então, testar se tal fenômeno seria capaz de ocorrer com outras linhagens celulares e se o mesmo fenômeno ocorreria quando as células eram semeadas sobre diferentes substratos. Os ensaios foram realizados com a utilização da diluição de 1:100 de soro total dos anticorpos anti GST-PrPc e anti integrina β -1 e 3 μ g/100 μ l de IgG anti GST-PrPc.

As figuras 6 a 11 mostram os resultados obtidos respectivamente com células NIH3T3, NIH3T3c-jun, NIH3T3*ras*, A2058, SK Mel e C6. Para todas as células analisadas o bloqueio de PrPc com o soro anti GST-PrPc é capaz de inibir a adesão à LN em pelo menos 70%. O soro anti GST não tem nenhuma atividade sobre a adesão celular, e como esperado o anticorpo anti integrina β -1 é capaz de bloquear a adesão celular à LN (KUMAR 1998).

Na tentativa de mostrar que o envolvimento de PrPc na adesão celular é especificamente dado por sua interação com LN realizamos experimentos onde FN foi usada como substrato. Dados do nosso grupo mostram que PrPc não liga a FN *in vitro* (GRANER et al. 2000b). Escolhemos então trabalhar apenas as células NIH3T3*ras* já que as outras linhagens comportam-se exatamente da mesma forma nos ensaios de adesão.

A Figura 12 mostra que células NIH3T3ras são capazes de aderir tanto em LN como em FN. Anticorpos anti integrina β -1 inibem a adesão aos dois substratos, uma vez que existem vários heterodímeros $\alpha\beta$ 1 passíveis de interação tanto em LN como em FN. O bloqueio de PrPc não inibe a adesão celular à FN, indicando que neste modelo de adesão à FN aparentemente o PrPc não está envolvido.

O sítio de interação de PrPc na LN já foi mapeado pelo nosso grupo (GRANER et al. 2000a) e reside num peptídeo da região carboxi-terminal da cadeia γ -1 de LN (RNIAEIIKDI). Este peptídeo foi usado como substrato em ensaios de adesão, na concentração de 0,2 μ g/ml (LIESI et al. 1992), para avaliar se o peptídeo γ -1 seria capaz de substituir a LN inteira e qual seria o seu efeito quando a interação PrPc-peptídeo γ -1 fosse desafiada com anticorpos anti-PrPc. Um peptídeo irrelevante contendo os mesmos amino ácidos mas em diferentes posições (IRADIEIKIN) foi usado como controle.

A Figura 13 mostra que as células são capazes de aderir ao peptídeo γ -1 da LN tão ou mais eficientemente que à LN inteira, enquanto que nenhuma adesão é visualizada quando o peptídeo irrelevante foi usado como substrato. O bloqueio de PrPc foi capaz de inibir a adesão celular ao peptídeo γ -1 em cerca de 90%.

Nossos dados anteriores sugeriam que PrPc era o único ligante do peptídeo RNIAEIIKDI da cadeia γ -1 de LN (GRANER et al. 2000a). Entretanto, nos ensaios mostrados na Figura 13 o anticorpo anti integrina β -1 inibe a adesão celular ao peptídeo γ -1.

Esses resultados poderiam ser interpretados pelo menos de duas formas. A interação da célula com o peptídeo da cadeia γ 1 de LN não é dada exclusivamente por PrPc mas também por integrina β 1, ou esta integrina pode estar ajusante na via de sinalização da interação PrPc-LN e seu bloqueio impedir a sinalização mediada por essa interação.

Dessa forma, resolvemos avaliar a adesão de fibroblastos de cultura primária de camundongos normais ou com o gen do PrPc retirado (PrPc0/0) sobre os diferentes substratos.

A figura 14 mostra o resultado de ensaios de adesão realizados com fibroblastos de cultura primária de camundongos normais sobre LN, FN e os peptídeos sintéticos específico da cadeia γ 1 da LN (RNIAEIIKDI) e irrelevante (IRADIEIKIN). Os resultados demonstram que fibroblastos de camundongos normais à semelhança de outras linhagens

utilizadas nesse trabalho, têm sua adesão à LN e ao peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de LN inibida por anticorpos anti-PrPc e anti integrina β -1.

A adesão à FN não é inibida por anti-PrPc mas é por anti integrina β -1. Além disso como mostrado para as outras linhagens não há adesão celular sobre o peptídeo irrelevante.

A figura 15 mostra o mesmo experimento realizado com as células dos animais PrPc0/0. As células não aderem ao peptídeo $\gamma 1$ de LN, indicando que a presença de PrPc é necessária para essa ligação. O resultado mais surpreendente desta figura reside no fato destas células não aderirem à LN, sugerindo fortemente que a adesão à LN é dependente da presença de PrPc na superfície celular. Pelo menos nas condições experimentais utilizadas, este trabalho mostrou que a presença de integrina β -1 e outros ligantes de LN não são suficientes para mediar a adesão a este substrato.

Este resultado poderia ser dado pela expressão alterada de integrina β -1 na superfície destas células. Procedemos então ensaios de citometria de fluxo onde mostramos que células de animais PrPc expressam integrina β -1 numa quantidade semelhante às células dos animais selvagens (Figura 16). Além disso, a integrina β -1 parece funcional nessas células, uma vez que elas aderem a FN e este evento é inibido por anticorpos anti integrina β -1 (Figura 15).

Sabendo-se que as migrações celulares são cruciais para o desenvolvimento e que as migrações descontroladas podem gerar muitas patologias em especial as metástases, decidimos testar a importância da interação PrPc-LN na migração celular. Realizamos inicialmente um experimento para padronizar o tempo necessário para que se atingisse o máximo de migração das células NIH3T3 frente à LN. Esta cinética de tempo está demonstrada na Figura 17, onde podemos observar que após 5 horas atingiu-se o valor máximo de migração. Podemos destacar ainda que é necessário um tempo de 24 horas para que 30% das células NIH3T3 migrem à LN, portanto o processo é muito menos eficiente em células normais.

Procedemos a seguir ensaios de migração com células marcadas metabolicamente à semelhança do que foi efetuado nos ensaios de adesão. Estas células foram usadas em ensaios de migração (haptotaxia) à LN, FN e aos peptídeos da cadeia $\gamma 1$ da LN e irrelevante, nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de adesão. As células foram tratadas com os anticorpos policlonais anti GST, anti GST-PrPc ou anti integrina β -1 na

diluição de 1:100 ou IgGs anti GST ou anti GST-PrPc purificadas na concentração de 3µg/100µl.

A Figura 18 mostra fotomicrografias representativas obtidas a partir da membrana do inserto onde foi realizado o ensaio de migração. As células coradas migraram frente ao substrato específico. A quantificação destes experimentos está ilustrada nas Figuras 19 (onde os substratos usados foram LN ou FN) e 20 (para os peptídeos γ -1 ou irrelevante). Os resultados mostram que o bloqueio da proteína PrPc da superfície celular é capaz de inibir a migração à LN e ao peptídeo γ 1. Também é possível observar eventos já vistos nos ensaios de adesão: (1) As células migram na presença de FN, sendo este evento bloqueado por anti-integrina β -1 mas não por anti GST-PrPc. (2) um maior estímulo migratório pelo peptídeo γ -1 do que pela LN (3) uma inibição proporcionalmente maior na migração para γ -1 do que para LN após bloqueio de PrPc. (4) tratamento de células com o anticorpo anti integrina β -1 inibe a migração ao peptídeo γ -1. Portanto, PrPc está envolvido com a migração celular à LN mas não à FN.

A capacidade de adesão e migração celulares pode estar relacionada ao fenótipo metastático de uma célula tumoral (KUMAR 1998). Desta forma resolvemos abordar este aspecto *in vivo* usando o ensaio de colonização pulmonar de células metastáticas.

A células NIH3T3 ras que são capazes de crescer livres de ancoragem, CHAMMAS et al. (1996) e formam colônias nos pulmões de camundongos, BRENTANI (1989) foram escolhidas como modelo. Estas foram tratadas com IgG total ou fração F(ab)₂ de IgG anti GST-PrPc para bloquear PrPc na superfície das células. IgG ou fração F(ab)₂ de soro anti GST foram utilizadas como controle.

Foi necessário preparar a fração F(ab)₂ dos anticorpos uma vez que a presença de Fc poderia levar a ligação de complemento na superfície celular e sua conseqüente lise. A Figura 21 mostra a cinética de digestão de IgG com pepsina. Para produção da fração F(ab)₂ que tem cerca de 110 kDa e está indicada com uma seta.

Células NIH3T3 ras foram tratadas com as IgG ou F(ab)₂ de anti GST ou anti GST-PrPc e depois injetadas na veia caudal de camundongos Balb/c ou Suiços. A Tabela 3 mostra que o bloqueio de PrPc nestas células inibe em cerca de 50% número de colônias metastáticas no pulmão tanto de animais Balb/c como de Suiços. Portanto, estes resultados

sugerem fortemente que o PrPc está envolvido com a adesão das células NIH3T3*ras* aos pulmões e conseqüentemente a formação de colônias tumorais neste órgão.

4. FIGURAS E TABELAS

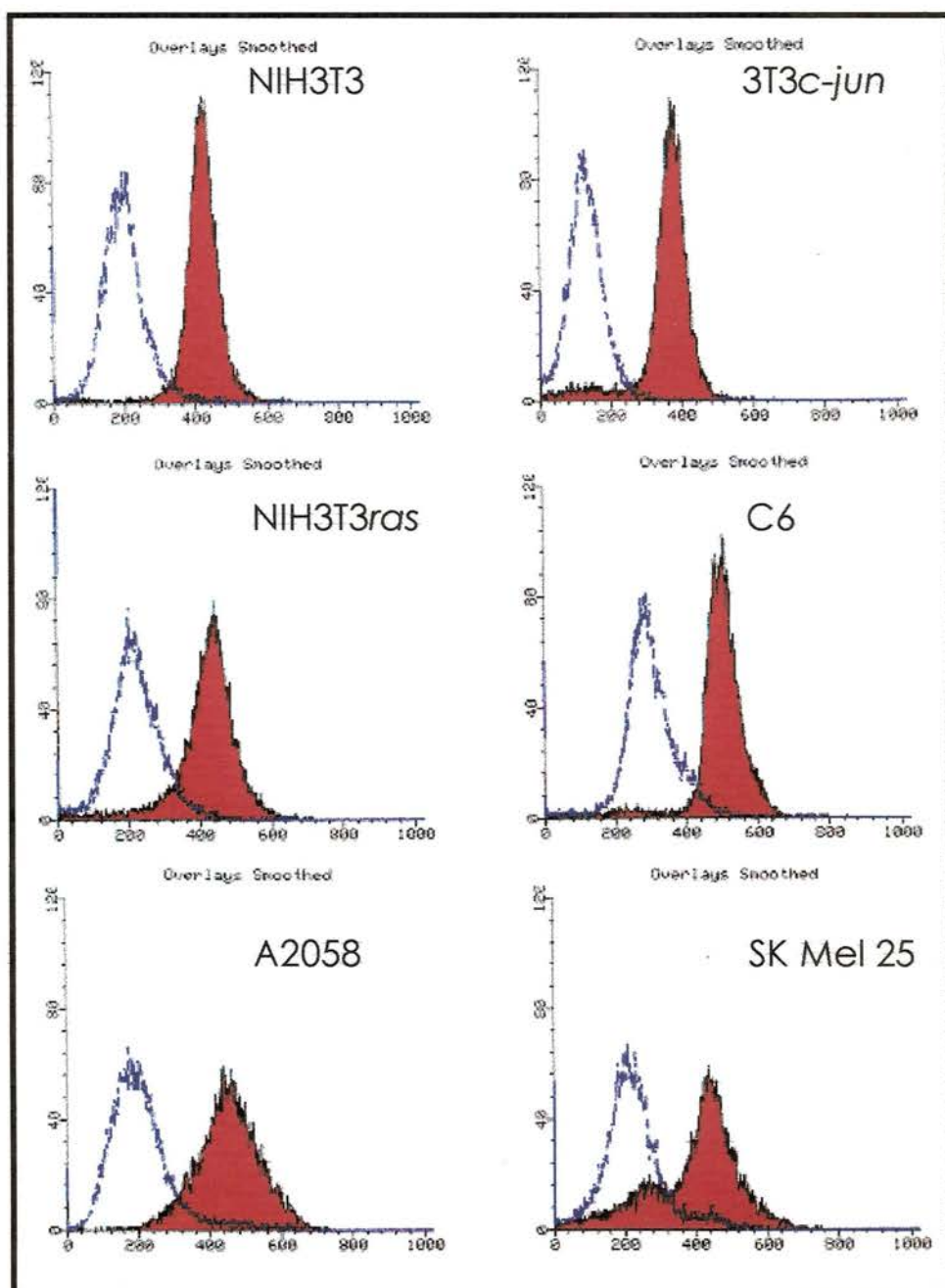


Figura 1

Avaliação da expressão de PrPc na superfície celular por Citometria de Fluxo.

As diferentes linhagens celulares foram incubadas com soro irrelevante ou com soro anti-PrPc (1:100). A reação foi revelada com soro de cabra anti-IgG de camundongo marcada com FITC (1:80). As curvas representam a intensidade de fluorescência obtida pela análise em FACSscan das células incubadas com soro irrelevante (azul) e com soro anti-PrPc (vermelha).

Tabela 2

Células	Médias $\pm$ desvio padrão (anti-PrPc - soro pré-imune)	n° de amostras
NIH3T3	251 $\pm$ 8	n=4
NIH3T3 <i>c-jun</i>	193 $\pm$ 7	n=4
NIH3T3 <i>ras</i>	207 $\pm$ 7	n=4
A2058	225 $\pm$ 9	n=3
SK Mel 25	184 $\pm$ 6	n=4
C6	182 $\pm$ 5	n=8

Valores médios da intensidade de fluorescência específica obtida por citometria de fluxo a partir da subtração da fluorescência proveniente das células tratadas com anti-PrPc daquelas obtida com soro irrelevante.

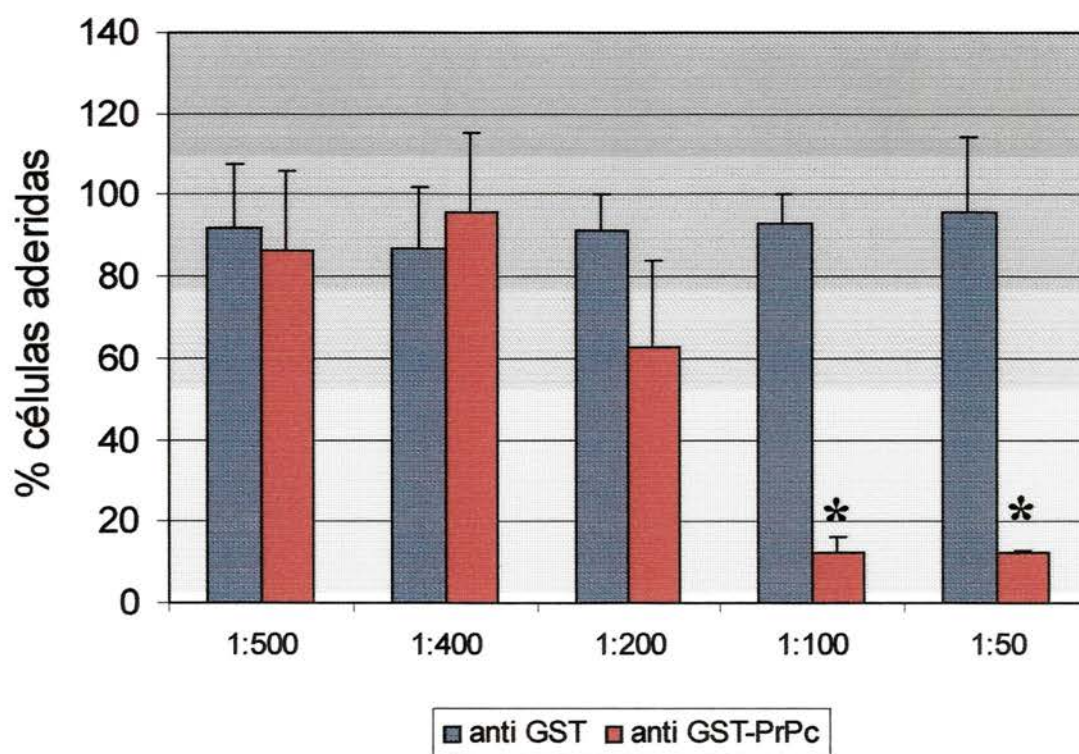


Figura 2

Titulação da atividade de soro policlonal anti GST-PrPc sobre a adesão celular à LN.

Células NIH3T3 ras tratadas com soro anti GST ou soro anti GST-PrPc nas diluições assinaladas, foram semeadas sobre LN (10 μ g/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro anti GST).

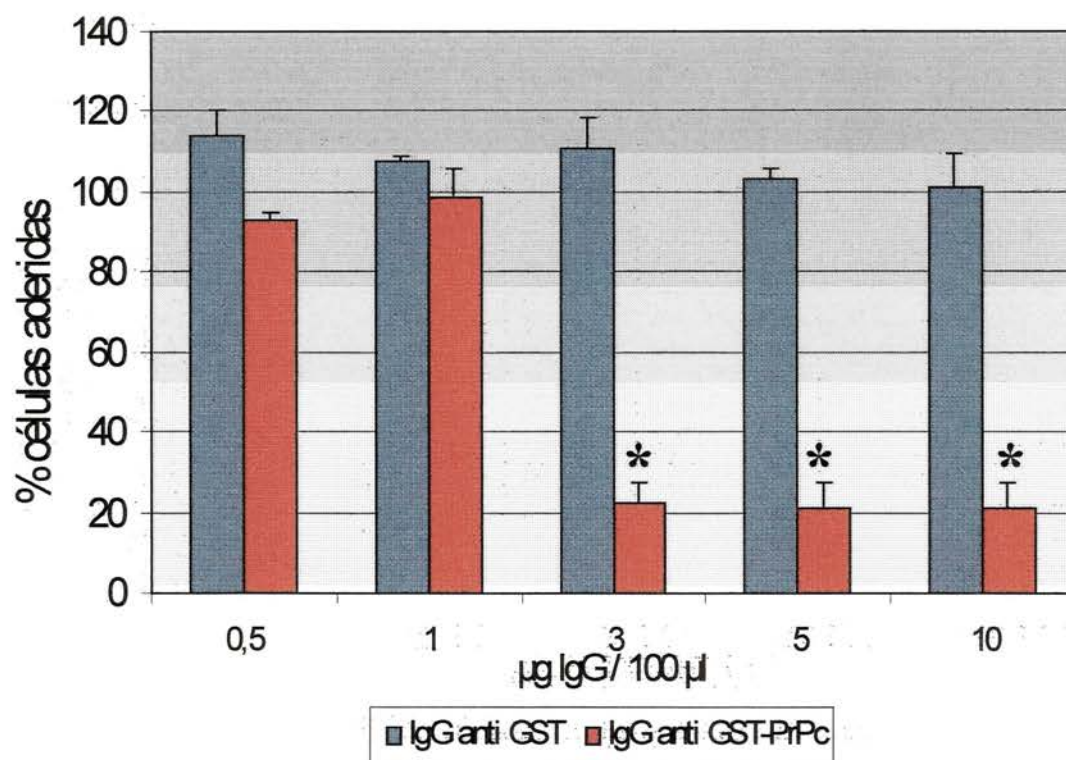


Figura 3

Titulação da atividade de soro IgG anti GST-PrPc sobre a adesão celular à LN.

Células NIH3T3 ras tratadas com IgG anti GST-PrPc nas concentrações assinaladas, foram semeadas sobre LN (10 µg/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com IgG anti-GST).

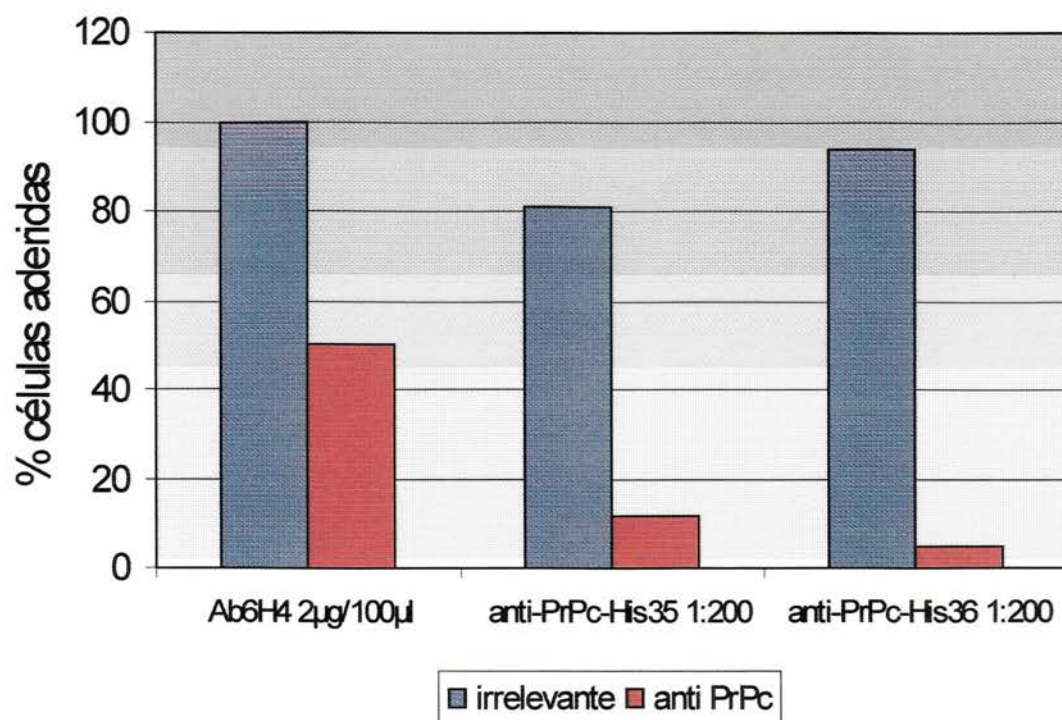


Figura 4

Atividade de diferentes soros anti-PrPc sobre a adesão celular à LN.

Células NIH3T3 $_{ras}$ foram tratadas com anticorpo monoclonal anti peptídeo 136-140 de PrPc humano (Ab6H4) ou soros policlonais de coelhos (denominados de 35 e 36), anti a proteína recombinante 6Hist-PrPc. As células foram semeadas sobre LN (10µg/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). Os valores representam a média de 1 experimento realizado em triplicata.

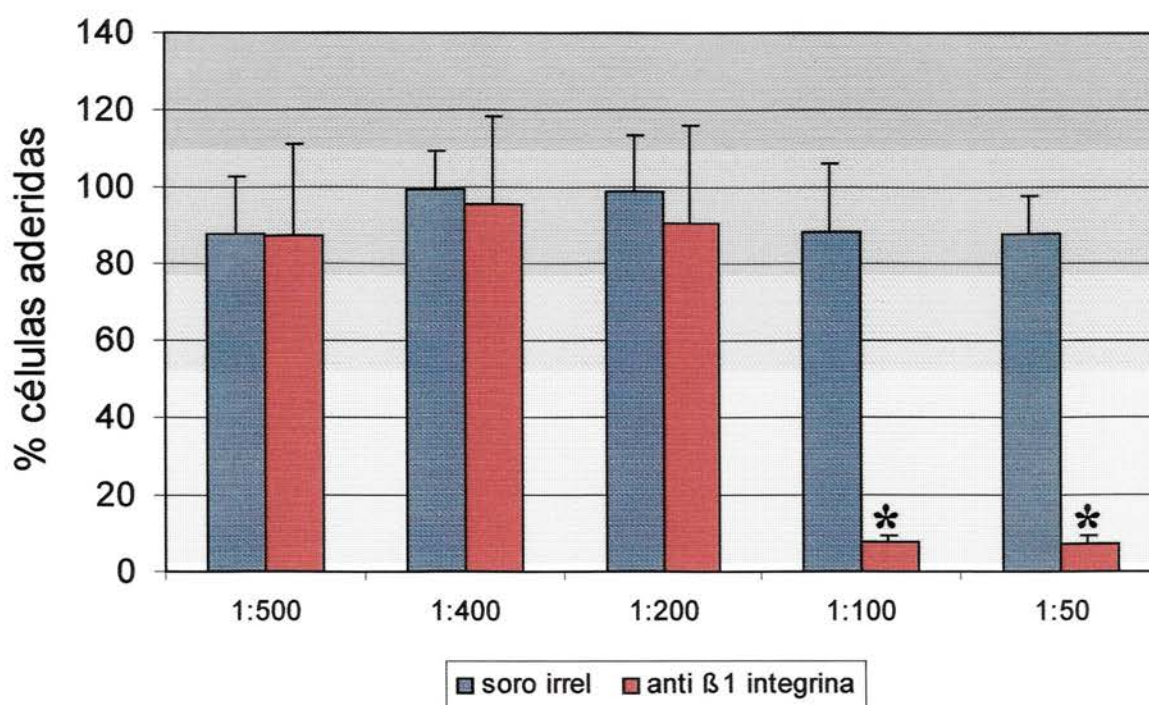


Figura 5

Titulação da atividade de soro policlonal anti integrina β -1 sobre a adesão celular à LN.

Células NIH3T3*ras* tratadas com soro anti integrina- β 1 foram semeadas sobre LN (10 μ g/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante).

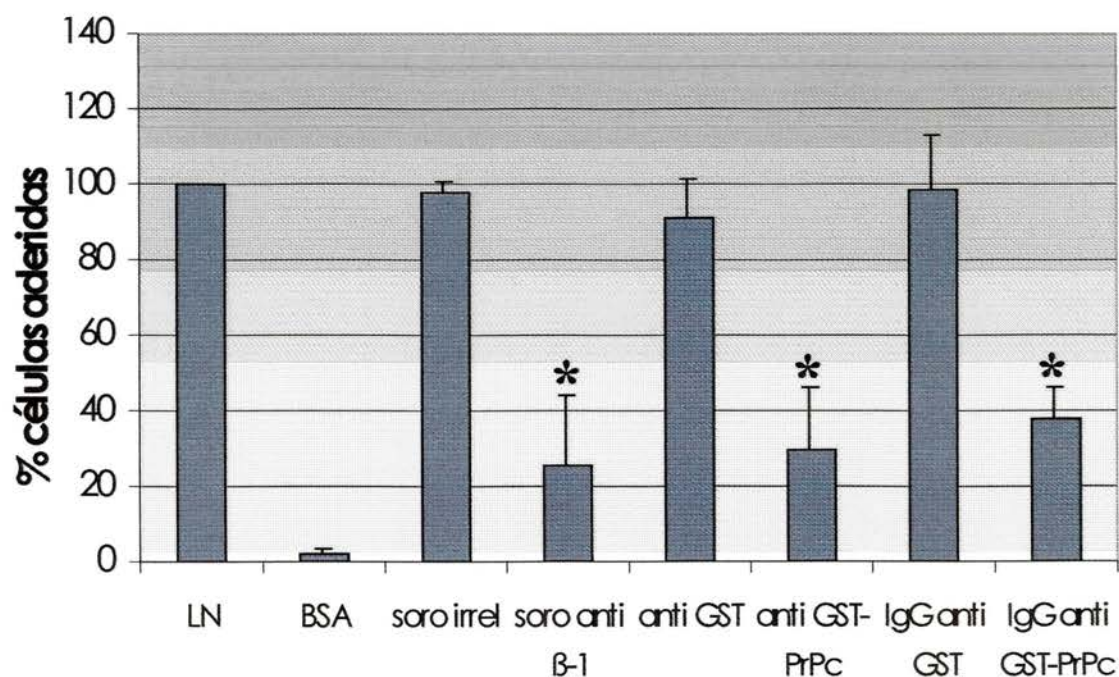


Figura 6

Inibição da adesão de células NIH3T3 à LN pelo bloqueio de PrPc.

Células NIH3T3 tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3µg/100µl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN (10µg/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

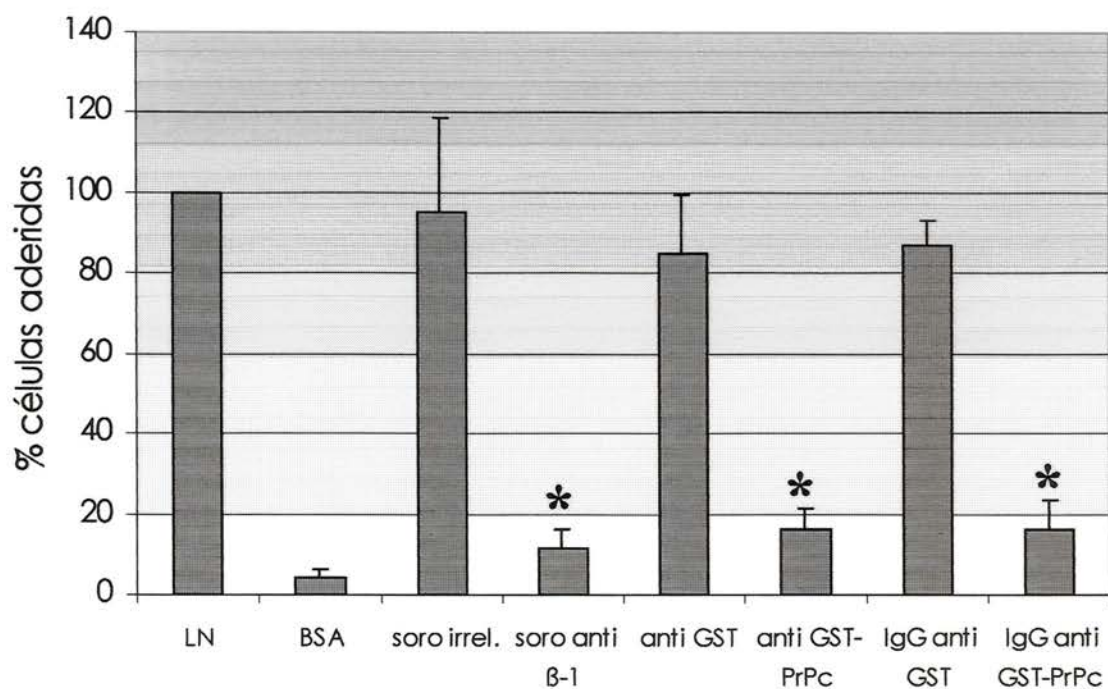


Figura 7

Inibição da adesão de células NIH3T3c-jun à LN pelo bloqueio de PrPc.

Células NIH3T3c-jun tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3µg/100µl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN (10µg/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

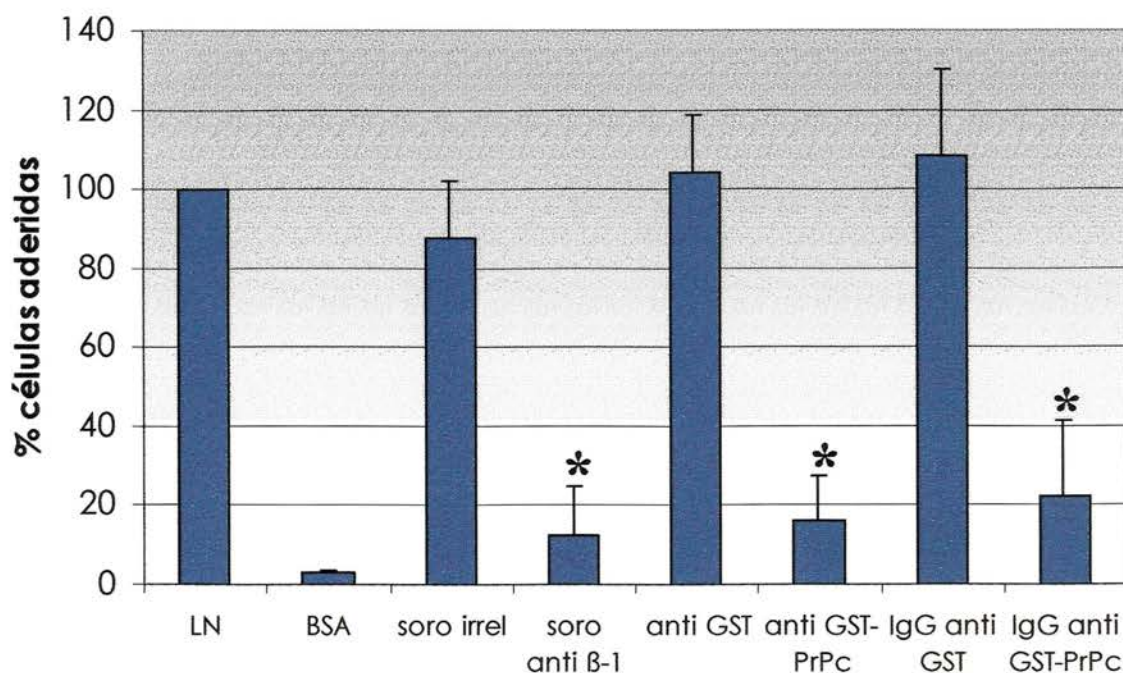


Figura 8

Inibição da adesão de células NIH 3T3*ras* à LN pelo bloqueio de PrPc.

Células NIH3T3*ras* tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3µg/100µl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN (10µg/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

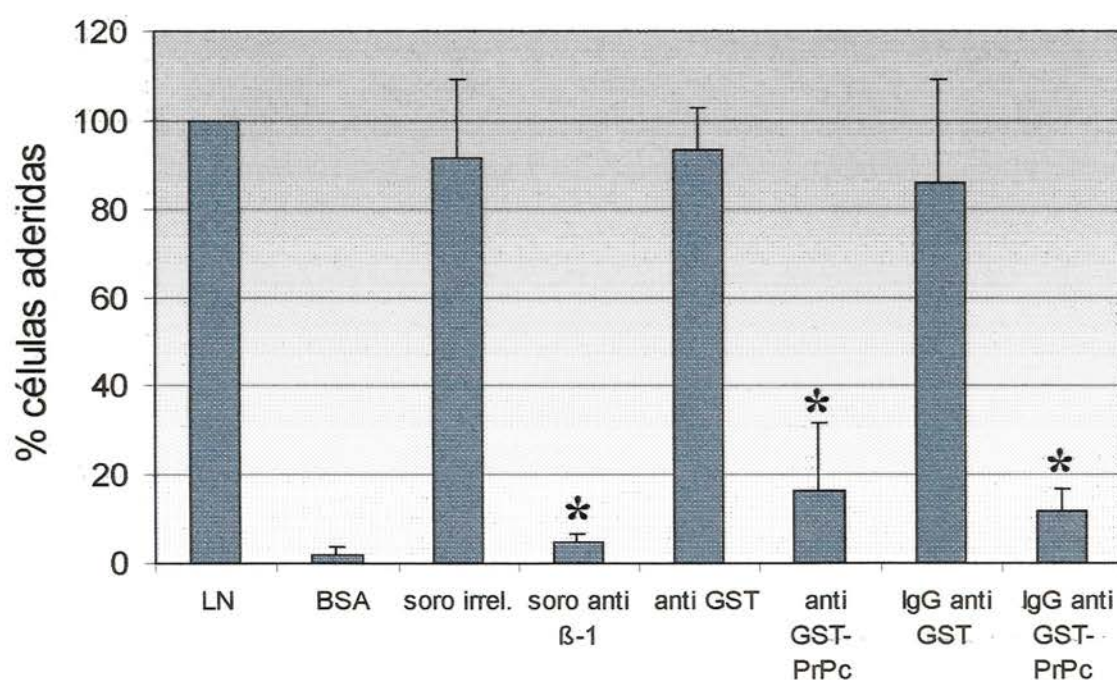


Figura 9

Inibição da adesão de células A2058 à LN pelo bloqueio de PrPc.

Células A2058 tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3 μ g/100 μ l (IgG purificada), foram semeadas sobre LN (10 μ g/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

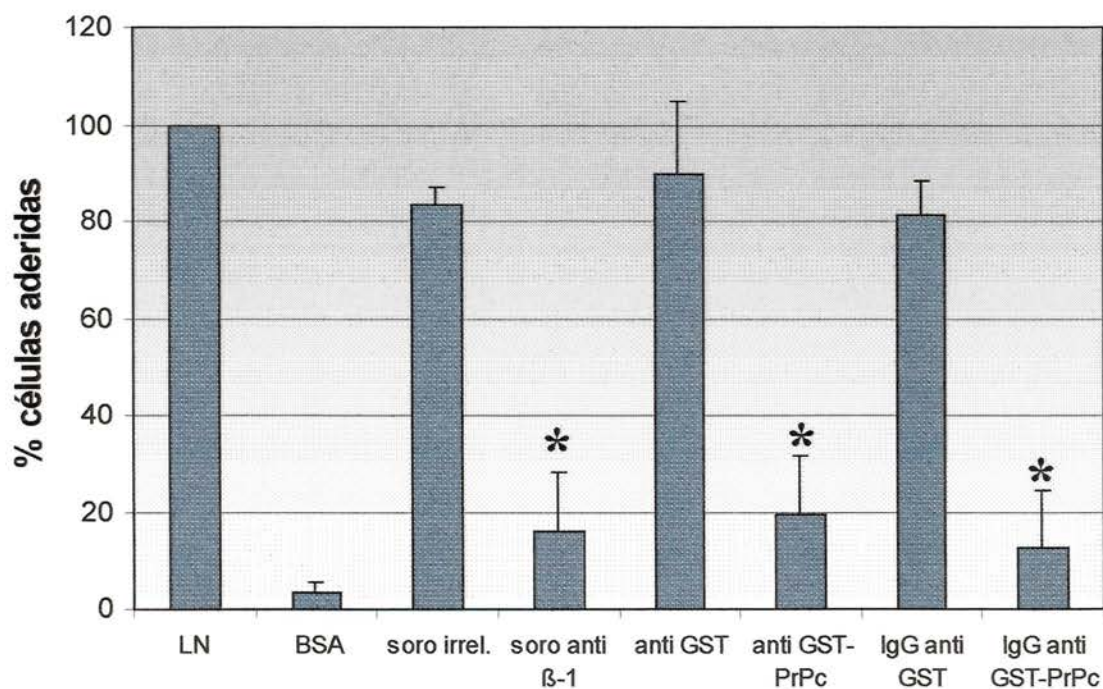


Figura 10

Inibição da adesão de células SK Mel 25 à LN pelo bloqueio de PrPc.

Células SK Mel 25 tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou $3\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ (IgG purificada), foram semeadas sobre LN ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

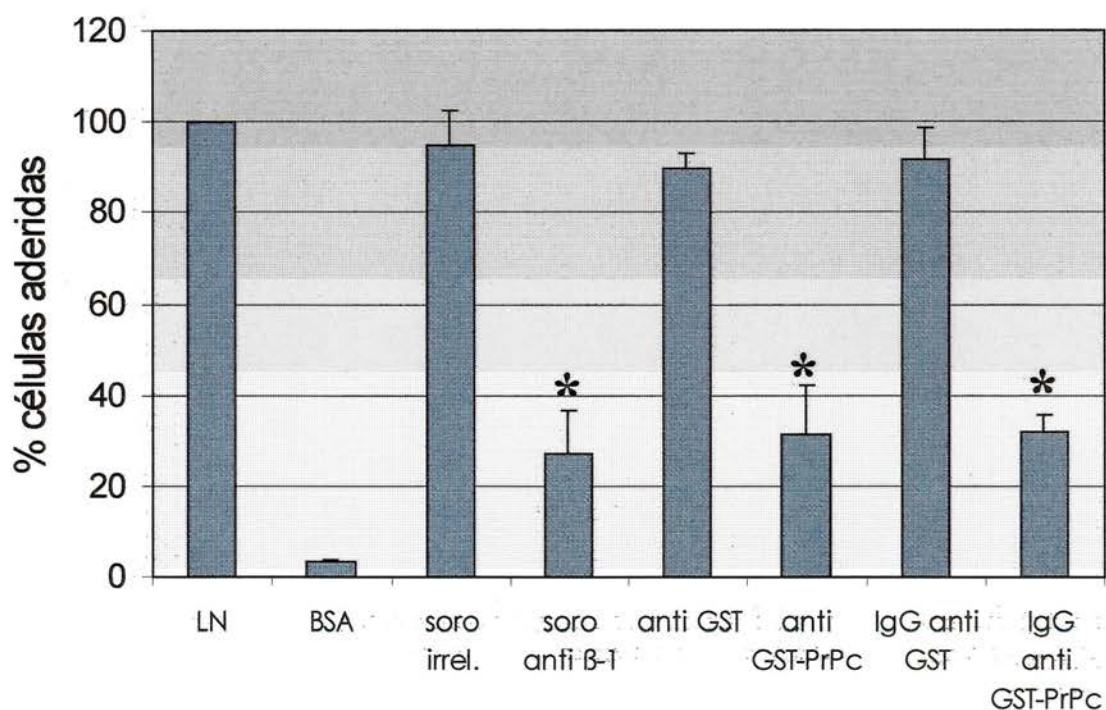


Figura 11

Inibição da adesão de células C6 à LN pelo bloqueio de PrPc.

Células C6 tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3 µg/100 µl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN (10 µg/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

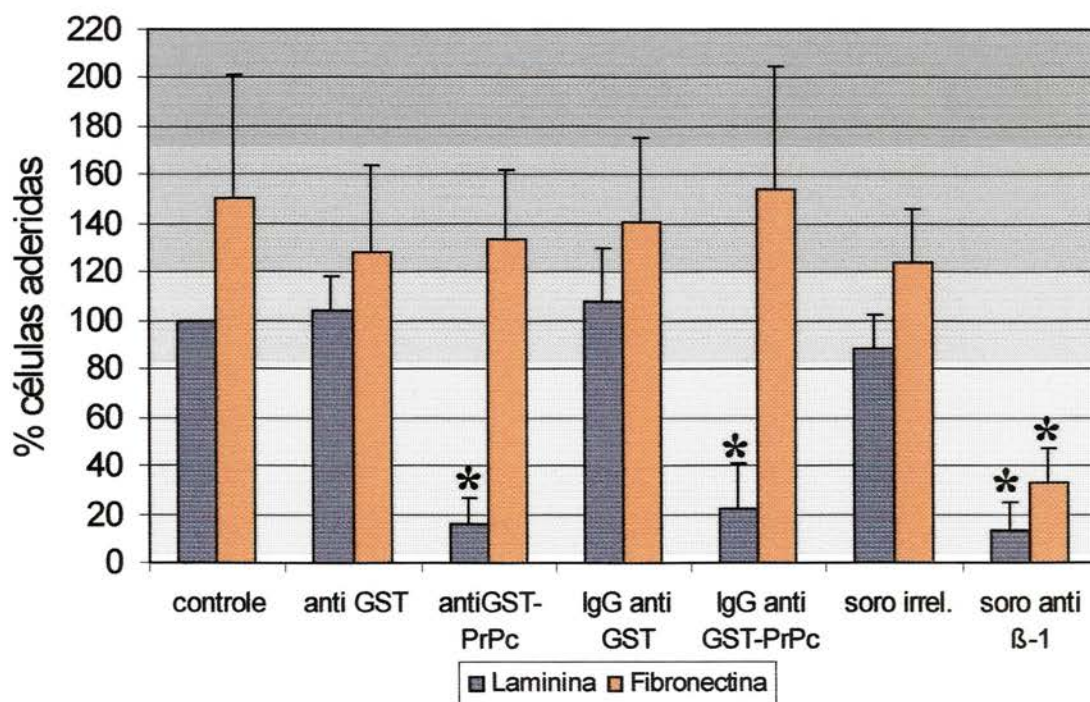


Figura 12

Bloqueio de PrPc em células NIH 3T3_{ras} inibe adesão a LN mas não a FN.

Células tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3 µg/100 µl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN ou FN (10 µg/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento semeadas sobre LN (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

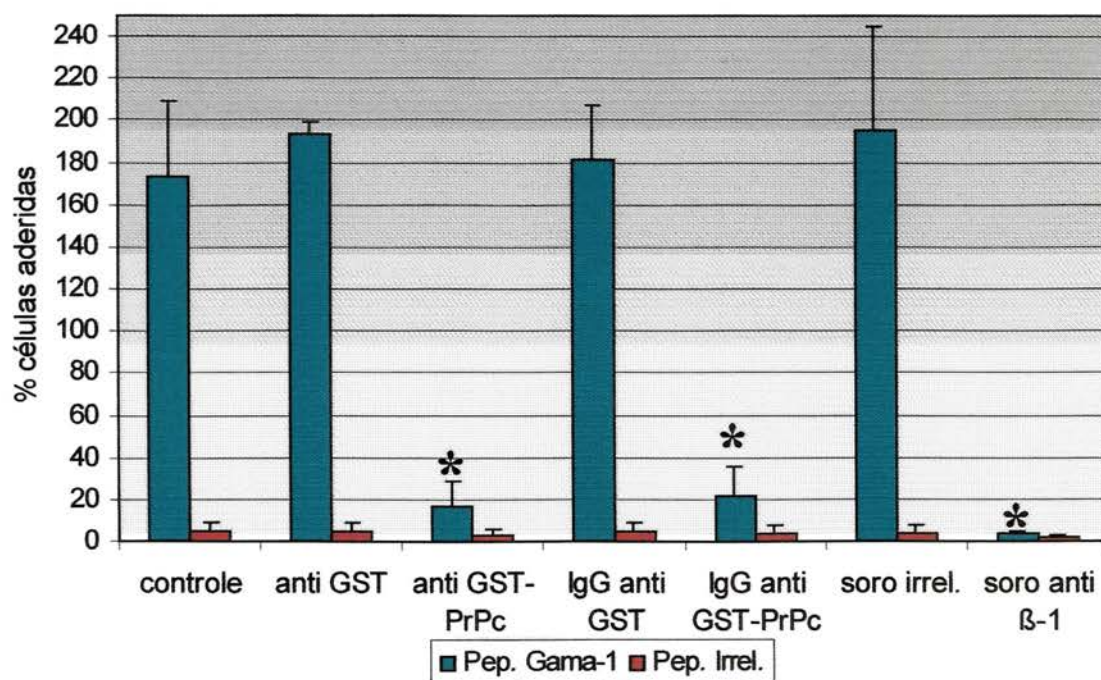


Figura 13

Bloqueio de PrPc em células NIH3T3_{ras} inibe a adesão ao peptídeo da cadeia γ 1 da LN.

Células tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3 μ g/100 μ l (IgG purificada), foram semeadas sobre peptídeo da cadeia γ -1 da LN ou peptídeo irrelevante (0,2 μ g/ml). A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento semeadas sobre LN (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

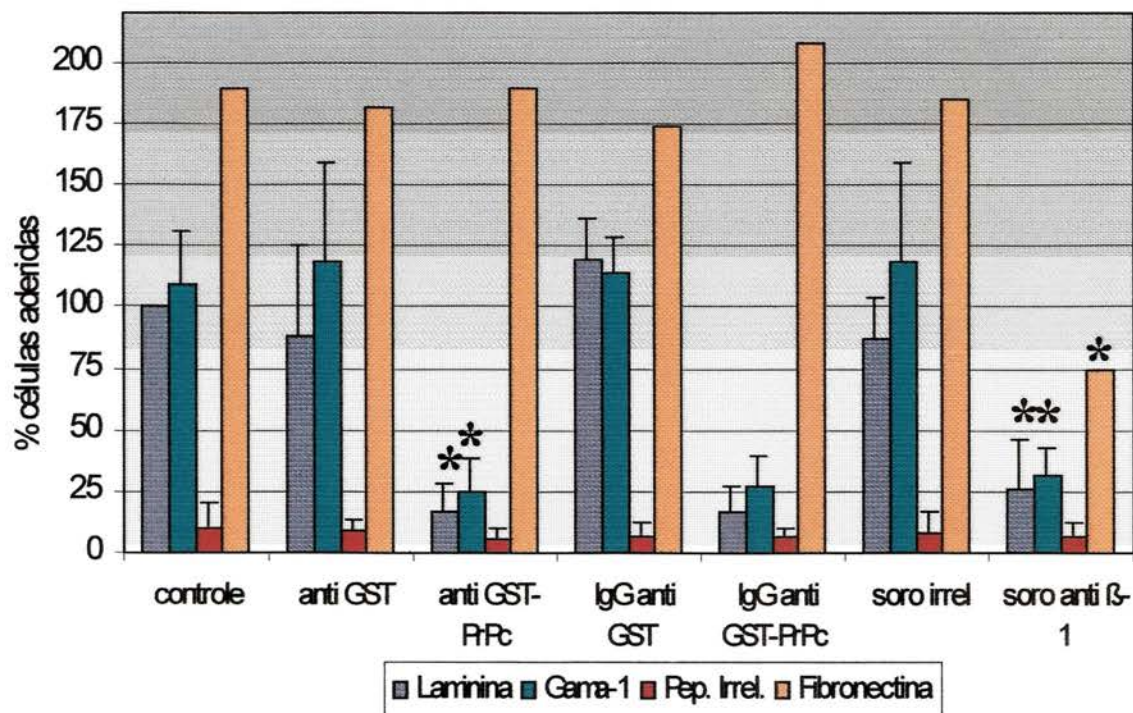


Figura 14

Bloqueio de PrPc em fibroblastos de culturas primária de camundongos selvagens (PrPc^{+/+}) inibem a adesão a LN, e ao peptídeo da cadeia γ-1 da LN mas não à FN.

Células tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3μg/100μl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN, peptídeo da cadeia γ-1 da LN, peptídeo irrelevante (0,2μg/ml) ou FN. A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento semeadas sobre LN (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação aos controles interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

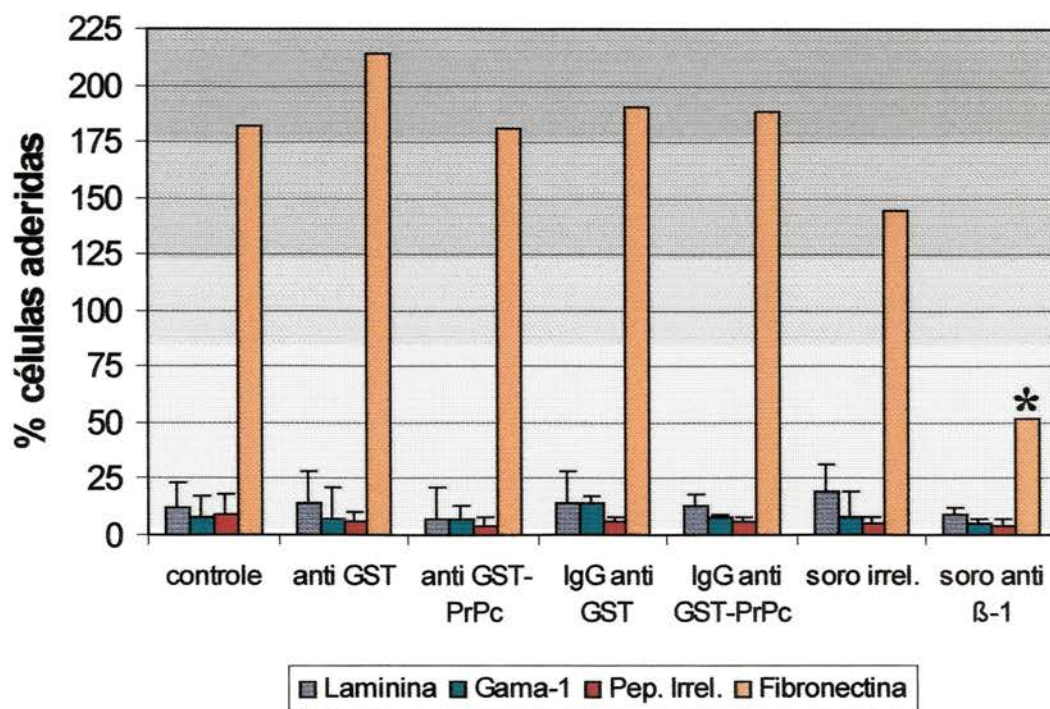


Figura 15

Fibroblastos de cultura primária de animais que tiveram o gene do PrPc removido (PrPc ^{-/-}) aderem à FN mas não aderem à LN e ao peptídeo da cadeia γ-1 de LN.

Células tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3µg/100µl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN, peptídeo da cadeia γ-1 da LN, peptídeo irrelevante (0,2µg/ml) ou FN. A adesão foi medida em valores relativos à adesão das células sem nenhum tratamento semeadas sobre LN (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

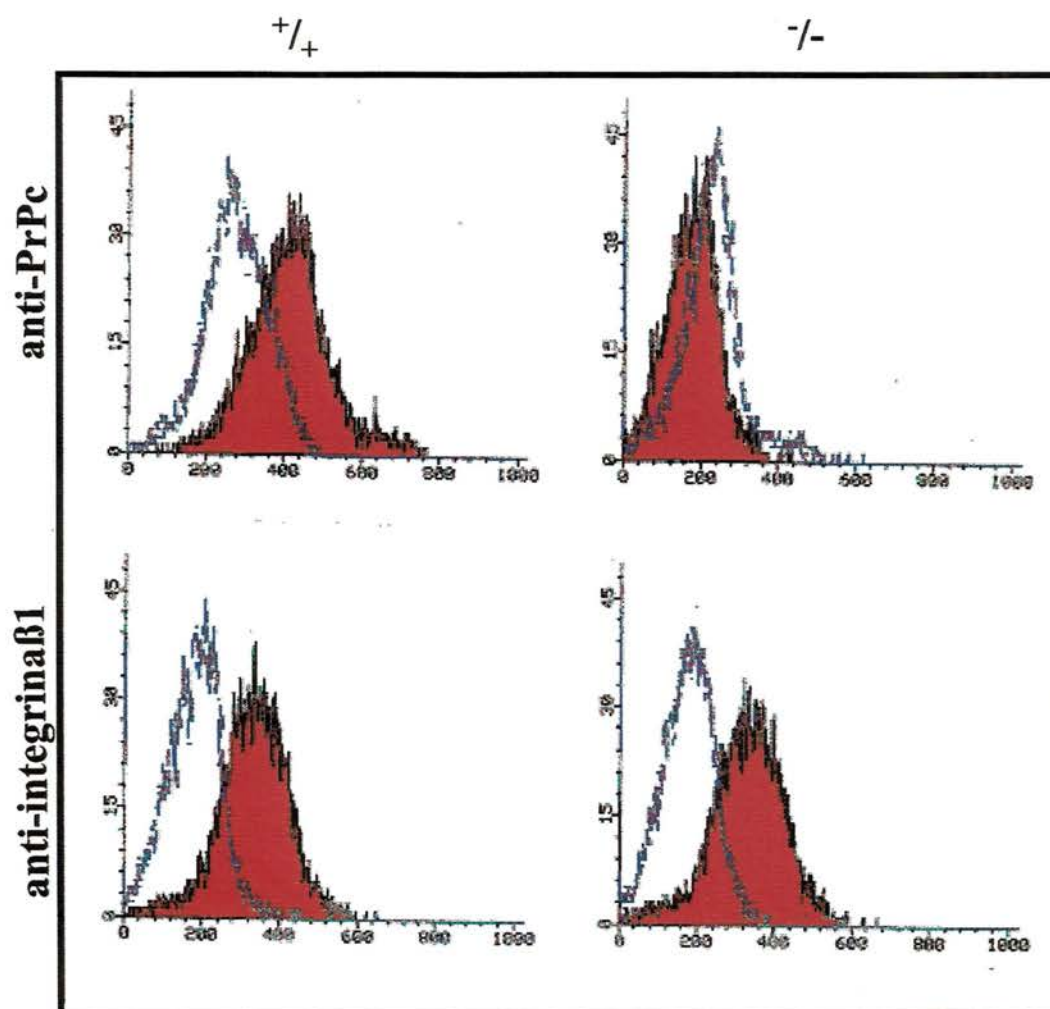


Figura 16

Quantificação de integrina β -1 e PrPc em cultura primária de fibroblastos de animais PrPc $+/+$ e PrPc $-/-$.

Fibroblastos foram obtidos de embriões de camundongos selvagens (PrPc $+/+$) e que tiveram o gene do PrPc removido (PrPc $-/-$) com 14 dias. As células foram incubadas com anticorpos policlonais anti integrina β -1 ou anti-PrPc na diluição de 1:100. A reação foi revelada com soro de cabra anti-IgG de coelho camundongo marcada com FITC (1:80). As curvas representam a intensidade de fluoresceína obtida por citometria de fluxo das células incubadas com soro irrelevante (azul) e soro anti-PrPc (painel superior) ou anti integrina β -1 (painel inferior) (vermelha).

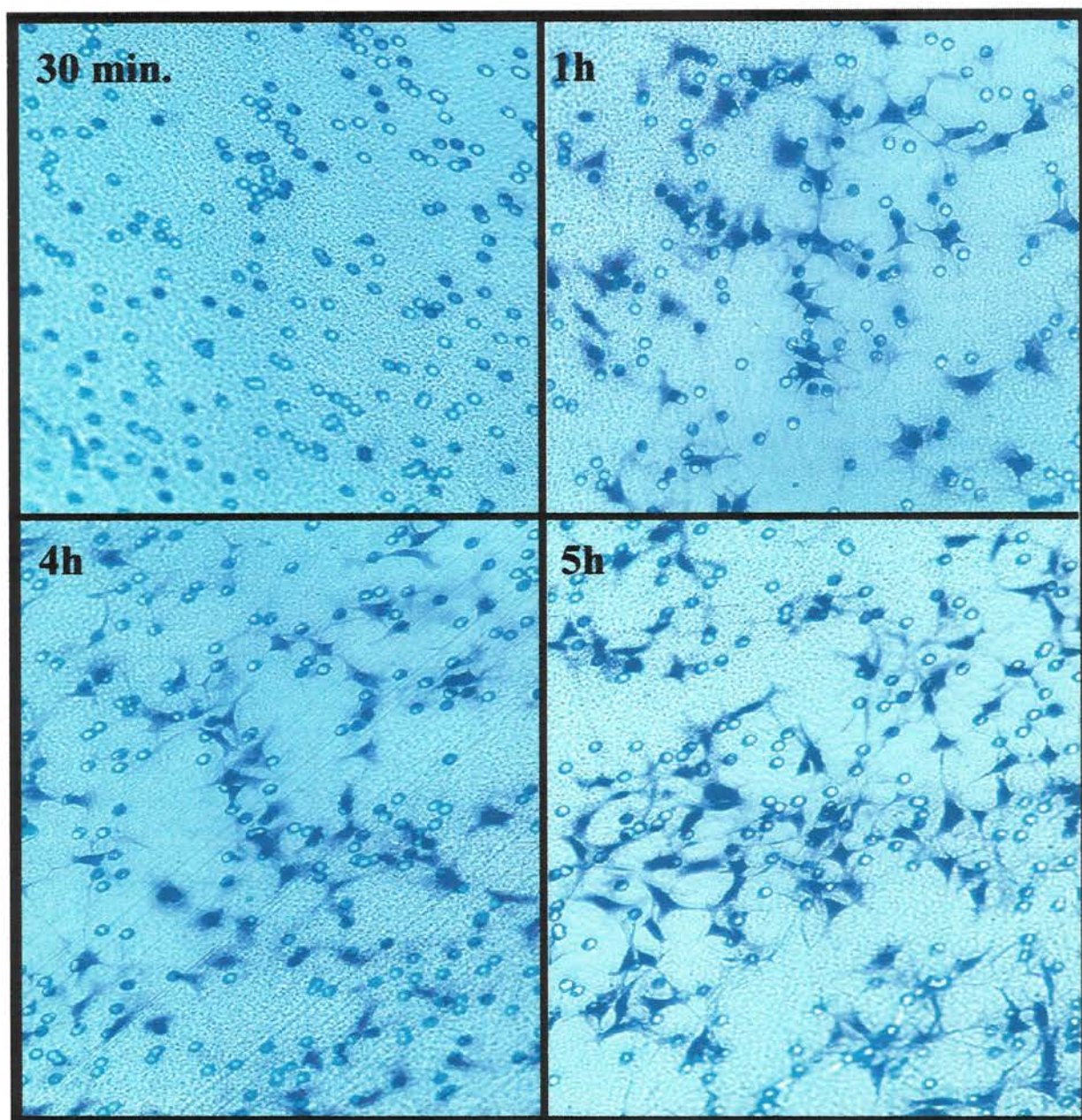


Figura 17

Cinética de Migração das células NIH3T3ras.

Migração das células NIH3T3ras. 2×10^5 células foram colocadas em inserto de Transwell com LN na parte superior do inserto e após os períodos de migração marcados na figura, os insertos foram fixados e corados com solução de azul de toluidina (20 X).

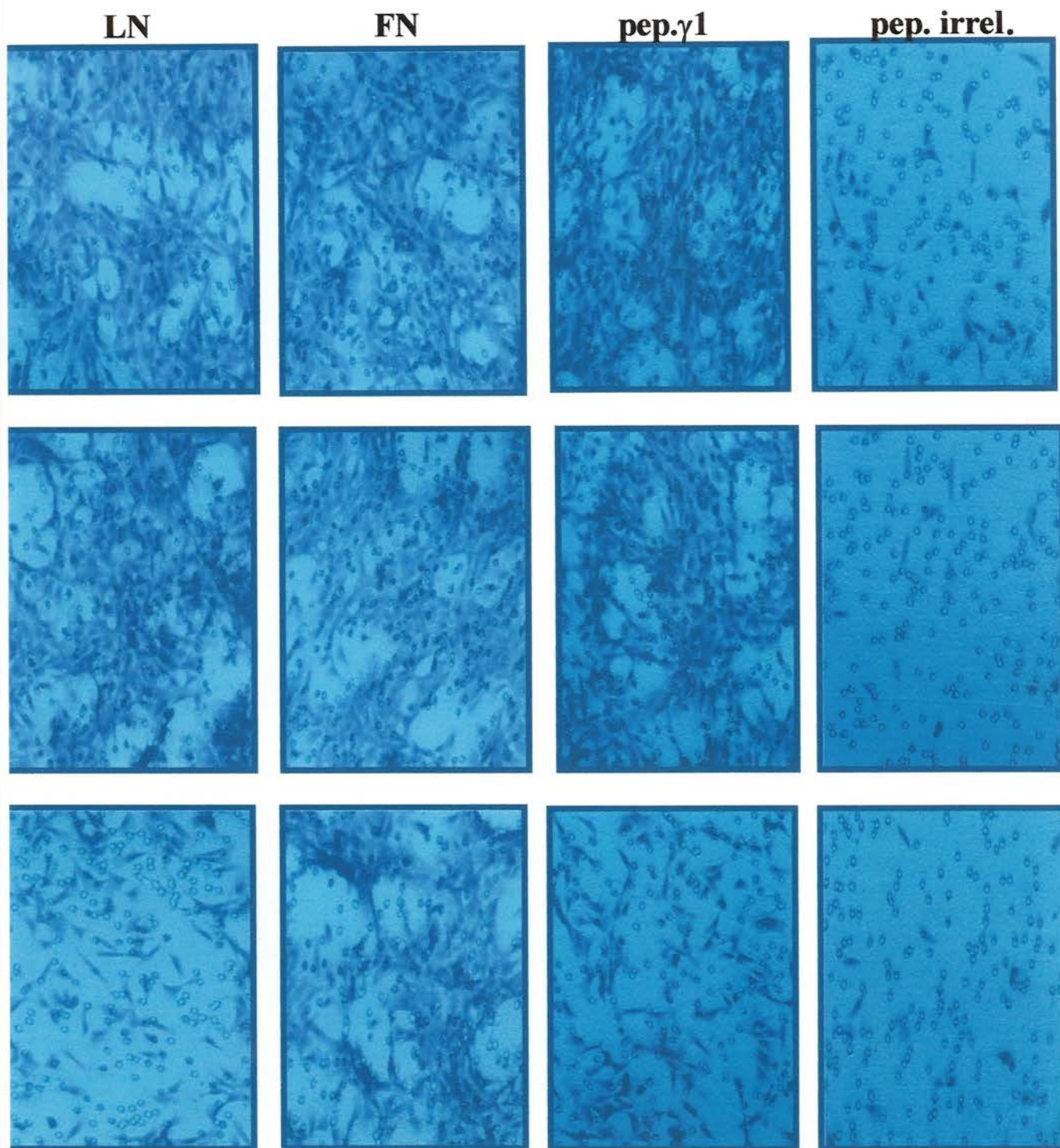


Figura 18

Bloqueio de PrPc em células NIH3T3ras inibe a migração para LN e peptídeo da cadeia γ -1 de LN mas não a FN.

Células não tratadas e tratadas com anticorpos policlonais anti GST ou anti GST-PrPc na diluição de 1:100 foram semeadas sobre LN, FN, peptídeo γ -1 e peptídeo irrelevante (10X).

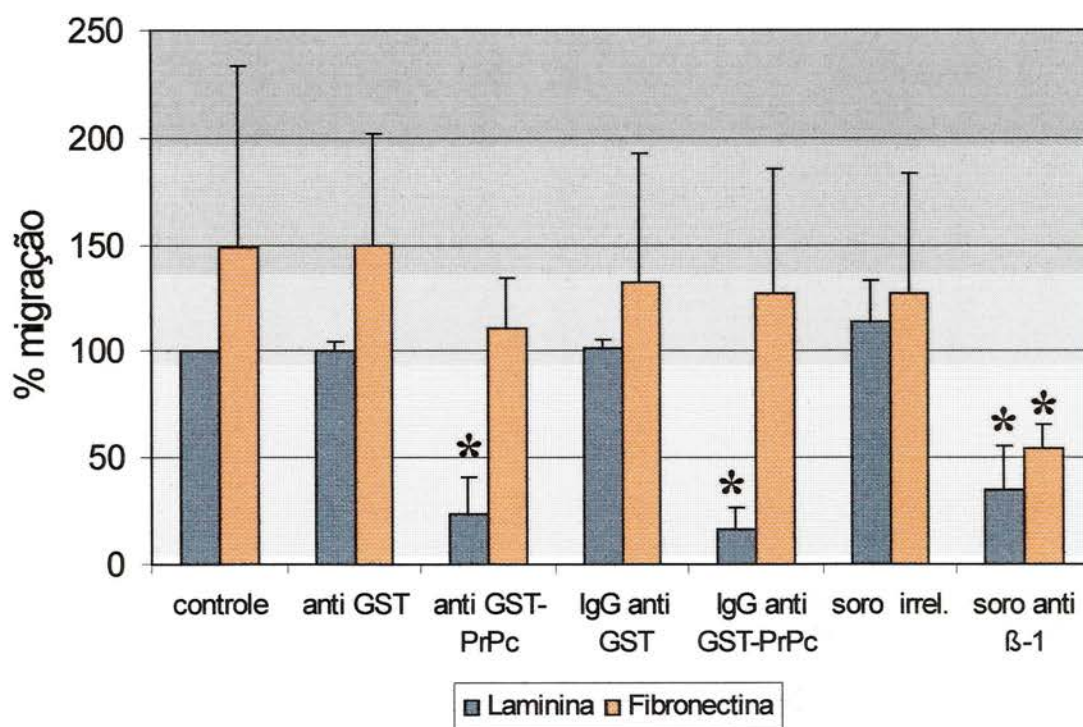


Figura 19

Bloqueio de PrPc em células NIH3T3ras inibe a migração à LN mas não à FN.

Células NIH3T3ras tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3µg/100µl (IgG purificada), foram semeadas sobre LN e FN (10 µg/ml). A migração foi medida em valores relativos à migração das células sem tratamento semeadas sobre LN (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

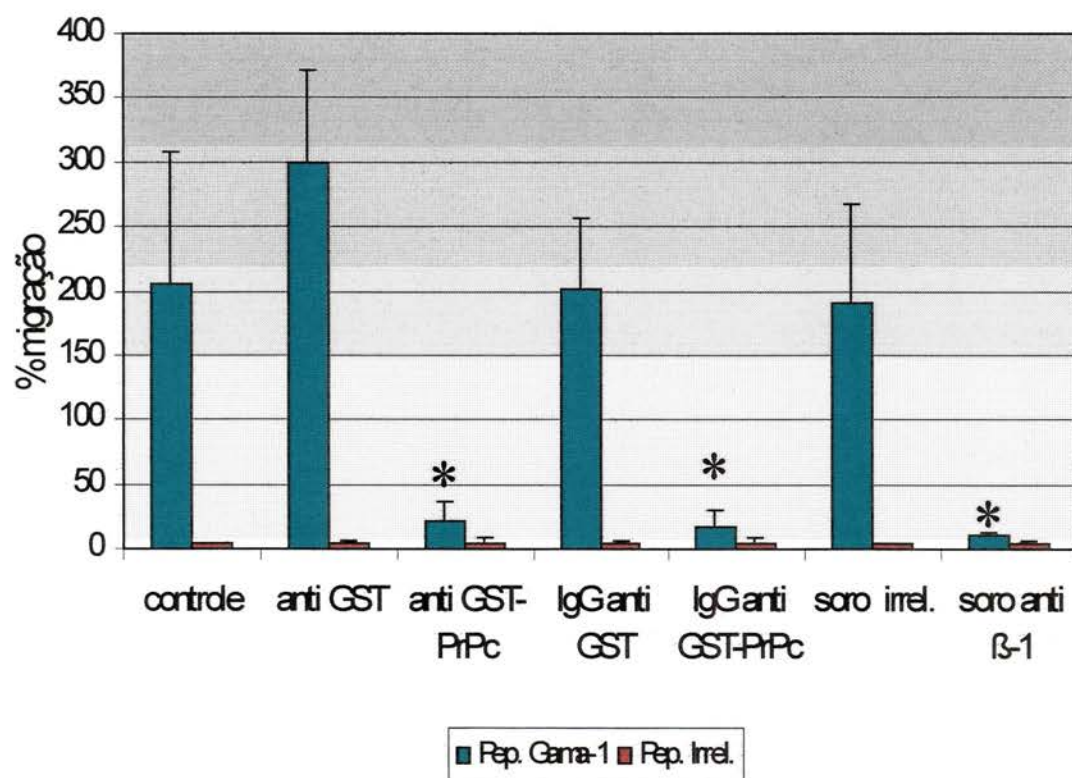


Figura 20

Bloqueio de PrPc em células NIH3T3 ras inibe a migração ao peptídeo da cadeia γ 1 da LN.

Células NIH3T3 ras tratadas com anticorpos assinalados na diluição de 1:100 (soro policlonal) ou 3 μ g/100 μ l (IgG purificada), foram semeadas sobre peptídeo γ -1 e peptídeo irrelevante (0,2 μ g/ml). A migração foi medida em valores relativos à migração das células sem nenhum tratamento semeadas sobre LN (controle=100%). As médias e os desvios padrões representam 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*Estatisticamente significativo em relação ao controle interno (tratamento com soro irrelevante, soro anti GST ou IgG anti GST).

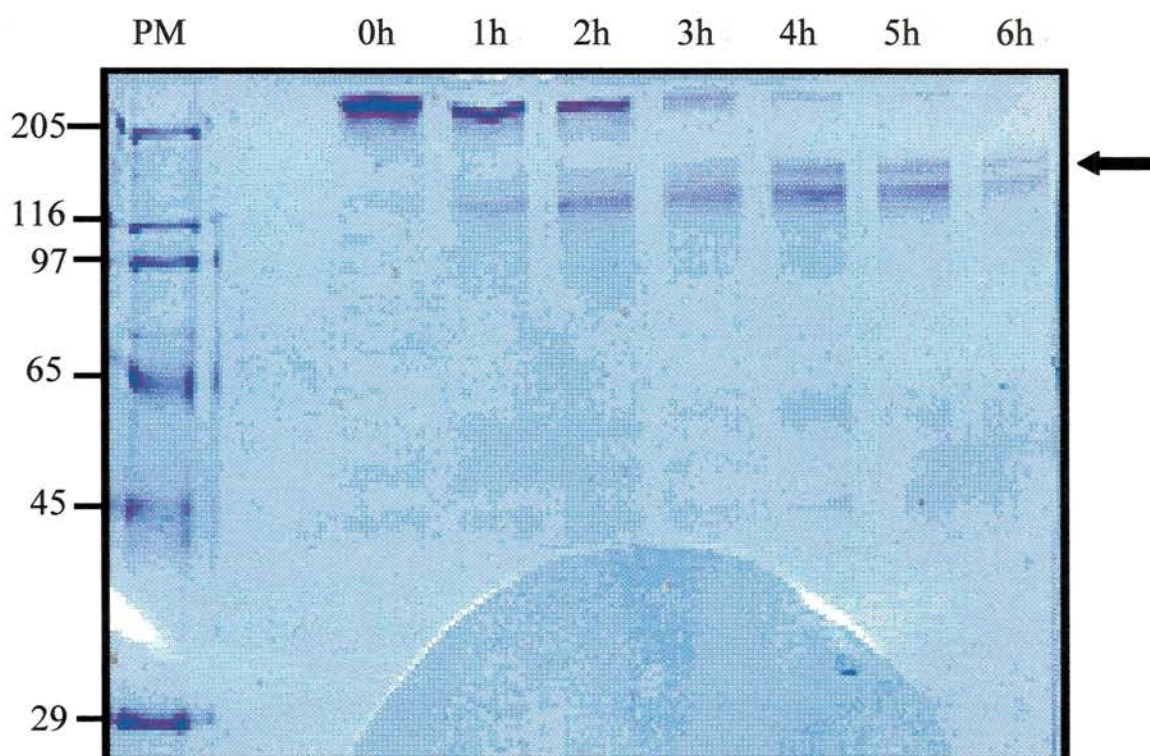


Figura 21

Cinética de digestão de IgG anti GST-PrPc com pepsina.

5 μ g IgG foram utilizadas para reação de digestão com pepsina. A cada hora alíquotas foram retiradas, a reação foi interrompida pelo acréscimo de 3M de Tris pH 8,8 e as amostras foram submetidas a SDS-PAGE não redutor (10%). A fração F(ab)₂ de 110 kDa esta indicada pela seta.

Tabela 3

Tratamento	Balb/c	Suíço
3T3ras	16 ± 5 (n=23)	13 ± 3 (n=8)
3T3ras + IgG soro irrelevante	16 ± 5 (n=23)	13 ± 3 (n=8)
3T3ras + IgG anti-PrPc	7 ± 3 (n=23) ¹	5 ± 1 (n=8) ³
3T3ras + F(ab) ₂ soro irrelevante	13 ± 4 (n= 5)	12 ± 3 (n=8)
3T3ras + F(ab) ₂ anti-PrPc	6 ± 2 (n=5) ²	6 ± 2 (n=8) ⁴

Valores obtidos dos ensaios de Colonização Pulmonar. As células NIH3T3ras foram ratadas como descrito acima e injetadas em camundongos Balb/c ou Suíço. Após 15 dias os animais foram sacrificados e o número de colônias pulmonares foram contadas e comparadas com o grupo injetado apenas com células ou soro irrelevante (controle).

1, 2, 3 e 4 = Valores estatisticamente significativos comparados com respectivos controles por teste *t-Student*.

1= Balb/c IgG soro irrelevante X IgG anti-PrPc (p = 0,0000)

2= Balb/c Fab₂ soro irrelevante X Fab₂ anti-PrPc (p = 0,0000)

3= Suíço IgG soro irrelevante X IgG anti-PrPc (p = 0,0002)

4= Suíço Fab₂ soro irrelevante X Fab₂ anti-PrPc (p = 0,0001)

5. DISCUSSÃO

A gênese do câncer pode ser correlacionada com as alterações que ocorrem no genoma celular, como as mutações nos genes supressores de tumor que podem passar a ser menos funcionais ou nos genes que conferem vantagens proliferativas. Para que ocorra a gênese tumoral, estima-se que uma célula deva sofrer de quatro a sete mutações para adquirir um fenótipo maligno (HANAHAHAN e WEINBERG 2000). Vários trabalhos têm mostrado que as células tumorais sofrem constantes mutações e embora os tumores possam originar-se a partir de uma única célula, quando se estuda os tumores verifica-se que são massas bastante heterogêneas, fato que é especialmente influenciado por fatores epigenéticos (CAHILL et al. 1999; JOTTI 1988).

Seis alterações principais são enumeradas como sendo essenciais para o surgimento e para progressão dos cânceres: 1 - constante geração de sinais proliferativos; 2 - insensibilidade aos fatores que deveriam inibir a proliferação; 3 - bloqueio da morte celular programada (apoptose); 4 - ilimitado potencial proliferativo garantido pela angiogênese; 5 - capacidade de invadir outros tecidos e 6 - capacidade de metastatização (HANAHAHAN e WEINBERG 2000).

A cascata da disseminação tumoral ou metástase culmina no deslocamento de células de um tumor primário para diferentes sítios. Vale lembrar que mesmo que as células sejam potencialmente capazes de originar diferentes tumores, se elas não encontrarem um microambiente passível de sobrevivência o tumor não se implantará e nem se disseminará, segundo teoria descrita por Paget (1889) citado por BUCK (1995). Durante a embriogênese os mecanismos complexos de adesão e perda da adesão (desadesão) são orquestrados para permitir a migração de maneira ordenada na formação de uma estrutura tecidual. Adesões seletivas são necessárias para o desenvolvimento dos tecidos na embriogênese. Todos os tecidos humanos apresentam capacidade adesiva entre as células que os constituem e entre as células e a matriz extracelular do tecido conectivo adjacente, o que mantém a integridade tecidual, mesmo na presença de estresse mecânico (GLOET et al. 1999).

As células epiteliais normais aderem à membrana basal mantendo-se num estado estacionário, entretanto essas entram em apoptose quando não ocorre essa interação (GLOET et al. 1999). A presença de diversas alterações genéticas pode levar as células à

aquisição de um fenótipo tumoral, permitindo que sobrevivam sem estarem aderidas com as suas membranas basais de origem (RUOSLAHTI 1999). Sabidamente a LN e a FN são cruciais para disseminação tumoral e alterações nas integrinas podem favorecer o comportamento maligno em ensaios *in vitro* e *in vivo* (LUKASHEV et al. 1998).

A caracterização de PrPc como um ligante de LN mostrou a possibilidade deste desempenhar um papel fora do sistema nervoso central (GRANER et al. 2000a,b). O fato de tanto PrPc como LN serem muito conservados evolutivamente e presentes em muitos tecidos, aponta esta interação como um fenômeno muito importante para a biologia da célula. Nosso trabalho baseou-se neste fato para estabelecer o papel de PrPc na adesão e migração de células normais e tumorais. A atividade de PrPc na capacidade de colonização pulmonar de células tumorais também foi avaliada.

A quantificação inicial da expressão de PrPc na superfície celular mostrou que todas as células estudadas expressam a mesma quantidade da proteína em questão. Estes resultados indicam que a transformação pelos oncogenes c-jun e H-ras não altera a expressão de PrPc quando comparada às células não transformadas (NIH3T3). A comparação entre as concentrações de PrPc em melanócitos normais e as células de melanoma usadas não foi feita pela não disponibilidade da primeira linhagem. Mas podemos estabelecer que melanomas altamente metastáticos também expressam PrPc na sua superfície. A literatura mostra constantemente que várias proteínas envolvidas com adesão celular como as integrinas descritas por (LUKASHEVE et al.1998), o receptor de 67 kDa (GLOET et al.1999), e as caderinas (CHAMMAS e VILLA 1993), podem ter sua expressão quantitativa e/ou estrutural alterada em células tumorais. Desta forma, embora conjecturamos em um primeiro momento que a expressão de PrPc poderia estar alterada quantitativamente após a transformação e aquisição do fenótipo metastático de algumas linhagens celulares, esse fato não foi confirmado. Entretanto, a invariabilidade na expressão de PrPc nas células não exclui a possibilidade de PrPc participar dos eventos aqui estudados.

O sítio de interação de PrPc na LN encontra-se em um peptídeo na região carboxi-terminal da cadeia γ -1 da última, e segundo mostramos PrPc parece ser o único ligante deste peptídeo (GRANER et al. 2000a). Ensaios realizados tendo o peptídeo γ -1 como substrato mostraram que ele é capaz de promover adesão celular, ao contrário do que

acontece com um peptídeo irrelevante. É notável ainda que esta adesão seja maior que a da LN. Uma interpretação provável deste resultado deve-se ao fato de que a concentração de peptídeo usado (0,2 $\mu\text{g/ml}$) baseou-se em dados da literatura (LIESI et al. 1992). Entretanto, se for levada em consideração o número de moles de peptídeo γ -1 contidos em 0,2 $\mu\text{g/ml}$ deste peptídeo, este valor seria aproximadamente 1000 vezes maior ao número de sítios γ -1 presentes em 10 $\mu\text{g/ml}$ de LN. No caso da FN o mesmo deva ocorrer, contudo com relação a outros sítios que promovem a adesão.

Os resultados encontrados evidenciam que o bloqueio de PrPc com anticorpos específicos inibe a adesão celular frente à LN e ao peptídeo γ -1, não o fazendo com FN. Esses dados estão de acordo com os resultados de ligações *in vitro*, onde PrPc mostrou interagir especificamente com LN e não com FN e CN tipo IV (GRANER et al. 2000b). Desta forma, esta interação pode ser considerada como possuidora das características necessárias (especificidade, afinidade e funcionalidade biológica) de um par receptor-ligante, da mesma forma como já foi descrito para os pares α 6 β 1 integrina-LN por SONNENBERG et al. (1988) e α 5 β 1 integrina-FN por PIOTROWICZ et al. (1988).

O resultado mais surpreendente foi o fato do bloqueio de integrina β -1 ter sido capaz de inibir a adesão celular ao peptídeo γ -1. Podemos imaginar que se integrina β -1 estiver na via de sinalização de PrPc-LN seu bloqueio teria um efeito semelhante ao da inibição de PrPc. Dada a sua localização na superfície celular externa, PrPc precisaria usar uma proteína transmembrânica para sinalização de sua interação com LN. Por outro lado, o peptídeo γ -1 poderia ser um sítio de interação com integrina β -1 ainda não identificado e esta região da LN não teria PrPc como único ligante como havíamos proposto (GRANER et al. 2000a).

Na tentativa de resolver esta questão fibroblastos de cultura primária provenientes de camundongos selvagens (PrPc^{+/+}) ou que tiveram o gene do prion celular removido (PrPc^{-/-}), foram semeadas sobre LN e sobre o peptídeo γ -1. As adesões foram avaliadas com as células tratadas ou não com os anticorpos anti-PrPc e anti integrina β -1. Os resultados mostram que os fibroblastos provenientes de animais normais comportam-se exatamente como as linhagens celulares já estudadas, entretanto os fibroblastos provenientes de animais PrPc^{-/-}, demonstraram não serem capazes de aderirem ao peptídeo

γ -1 nas condições experimentais utilizadas. Contudo, ensaios de citometria de fluxo demonstraram que a expressão de integrina β -1 na superfície dos fibroblastos selvagens e nos fibroblastos PrPc^{-/-} são quantitativamente comparável, além disso a integrina β -1 demonstrou ser funcional uma vez que foi capaz de gerar adesões de ambas as células à fibronectina. Estes dados sugerem que o domínio γ -1 da LN não é um sítio ligante de integrina β -1.

O mais surpreendente foi a observação de que as células de animais PrPc^{0/0} não aderem à LN apesar de expressarem integrina β -1. Nossos dados apontaram portanto, para um mecanismo totalmente novo onde a interação de PrPc-LN poderia ser um evento anterior, capaz de modular a ligação de integrina β -1 e outros receptores de LN a este processo.

Contudo não pode ser descartada a hipótese de que pelo menos para a interação integrina β -1 - LN, PrPc poderia funcionar como molécula reguladora ou acessória na adesão, aumentando ou diminuindo a afinidade de outros receptores de LN. Nas células PrPc^{0/0}, devido a falta de PrPc na superfície celular, as interações classicamente descritas para outros receptores de LN estariam parcialmente bloqueadas ou menos intensamente reguladas, faltando assim um ajuste fino para adesão à LN. Outro ponto que deve ser analisado é quanto ao "background" genético da cepa do animal utilizado, sendo este ponto de grande relevância para os fenótipos normalmente apresentados pelos animais que tiveram algum gene removido (WEISSMANN e AGUZZI 1999).

A participação de integrinas β -1 na transdução de sinal gerada pela interação PrPc-LN não é descartada e aliás continua a ser estudada pelo grupo.

A subunidade integrina β -1 é responsável por mediar a adesão célula-MEC (COPPOLINO 2000; JASIULIONIS et al. 1996). Quando a cadeia integrina β -1 não esta presente, não ocorre o contato da adesão focal, não acontecendo a interação com o citoesqueleto (TAYLOR et al. 1998).

As adesões focais são estruturas que medeiam a adesão das células à MEC. Essas estruturas resultam do agrupamento de receptores de integrinas que iniciam o recrutamento de numerosas proteínas citoplasmáticas, moléculas estruturais e regulatórias (STOSSEL 1993). As interações adesivas têm grande importância para migração celular, pois coordenam múltiplos sinais (MAÑES et al 2000). Durante o desenvolvimento embrionário

muitas células viajam longas distâncias até encontrarem seu destino final. Vários processos estão envolvidos na decisão de quando migrar, para onde ir e quando parar (STOSSEL 1993), as migrações também são importantes para auxiliar o processo de cicatrização e inflamação (HUTTENLOCHER et al. 1995).

A maquinária recrutada para efetivação da motilidade celular é bastante complexa, onde ocorre uma interação dinâmica entre as células e a MEC e para que isso seja efetivo, deve haver uma íntima associação dos receptores de superfície celular (integrinas) com o citoesqueleto, resultando numa rápida formação e dissolução da progressão celular sobre o substrato (Lee et al 1993). As integrinas ativadas pelos constituintes da MEC levam à fosforilação de resíduos de tirosina em cinases de adesão focal (FAK) p125^{FAK}, que além de elevar o pH celular, podem ativar a cascata de RAS/RAF/MAPK (proteínas ativadas por fatores mitogênicos) além de ativar a expressão gênica (SHALLER e PARSONS 1994).

As cinases de adesão focal (FAK) são ativadas pela maioria das integrinas (SCHALLER e PARSONS 1994). A cadeia integrina β -1 interage com talina, promotora do agrupamento das integrinas nas adesões focais. A talina interage com a vinculina e a paxilina (TAYLOR et al. 1998). FAK também pode ligar-se a muitas outras moléculas sinalizadoras (CHEN et al. 2000). CHEN et al. (2000) evidenciaram associação de β 1-FAK-paxilina e a cinase Fyn, que foi capaz de promover a adesão das células de Schwann à membrana basal.

Em contrapartida, RICHARD et al. (2000), especularam que PrPc poderia estar envolvida com a adesão celular ou com mecanismos de sinalização, uma vez que está localizada na face externa da membrana plasmática. No mesmo trabalho ficou demonstrado, com o uso de anticorpos anti-PrPc, a redução da fosforilação da tirosina cinase Fyn.

Podemos pensar então num mecanismo desencadeado pela interação LN-PrPc que module a associação com integrina β -1 levando a formação da placa de adesão focal e a sinalização celular regulada pela atividade de Fyn. Mecanismos semelhantes podem ser encontrados na literatura, como a capacidade da integrina α 5 β 1 de modular a interação de α v β 3 com VN nos processos de migração celular (BROOKS et al. 1994).

Os ensaios de migração celular foram realizados com a célula NIH3T3*ras* uma vez que migrações descontroladas estão relacionadas ao fenótipo tumoral e metastático

(HUTTENLOCHER et al. 1995). Alguns experimentos foram feitos com as células A2058, que se comportou exatamente como a NIH3T3*ras* nos ensaios realizados. Optamos em nos concentrar nas linhagens de camundongos, pois tivemos como meta transportar os ensaios para modelos *in vivo*.

Nossos ensaios de migração mostraram resultados muito semelhantes aos de adesão, onde PrPc é importante para o processo em LN mas não em FN. O peptídeo γ -1 medeia migração em valores maiores que a LN, sendo esta dependente de PrPc. Vale aqui o comentário feito para o ensaio de adesão quanto ao número de moles de cada reagente.

Da mesma forma que no ensaio de adesão o bloqueio de integrina β -1 inibe a migração celular para o peptídeo γ -1. Valem aqui novamente os comentários feitos na adesão com relação à participação de integrina β -1 na sinalização da interação PrPc-LN. Entretanto, o ensaio de adesão realizado com células de animais PrPc 0/0 não poderá ser transportado para o ensaio de migração. Isto se deve ao fato de células normais (não tumorais) terem baixa capacidade migratória neste tipo de abordagem experimental. Por outro lado, achamos que a resposta no ensaio de adesão é suficientemente forte para propor o mecanismo do processo.

Os ensaios de colonização pulmonar *in vivo* mostram resultados muito interessantes. O bloqueio de proteínas na superfície celular com anticorpos é lábil. A pergunta é: o anticorpo vai permanecer na superfície da célula pelo tempo necessário para se observar o efeito do bloqueio na colonização pulmonar? Em ensaios de citometria de fluxo sabemos que a ligação antígeno anticorpo é estável em até 2 horas. Quando injetamos células na veia da cauda dos animais o primeiro órgão que estas encontram é o pulmão, o que acontece em minutos. Portanto, tempo onde a proteína em estudo ainda está mascarada pelo anticorpo. No modelo, as células com maior capacidade de adesão devem permanecer no órgão enquanto as outras serão destruídas. Portanto, no intervalo de uma hora a colonização está encerrada, e as células darão origem a tumores visíveis a olho nú em 10 a 15 dias (BRENTANI 1989; CLARK et al. 2000).

Nossos dados mostram que o bloqueio de PrPc da superfície celular com IgG purificada de soro de coelho anti-PrPc bloqueia em cerca de 50% a formação de colônias pulmonares. O mesmo foi observado quando as células foram incubadas apenas com a porção F(ab)₂. Este controle foi adotado porque a presença da porção Fc na superfície pode

mediar a lise celular por fixação de complemento o que levaria a uma interpretação errônea dos resultados. Como o número de colônias encontradas nos dois tratamentos foi semelhante podemos sugerir que neste sistema empregado a porção Fc do anticorpo não fixa complemento e, portanto não leva à lise celular.

Os tumores foram produzidos inicialmente em camundongos Balb/c devido a sua disponibilidade no biotério. Além disso, outros membros do laboratório já haviam mostrado a capacidade de células NIH3T3*ras* produzirem tumores nesta cepa de camundongos. Repetimos portanto, os experimentos usando a cepa de camundongos Suíços que foram os animais que deram origem a linhagem NIH3T3 (ROWETT et al. 1990). Os resultados mostram que as células são capazes de originar tumores nas duas cepas de camundongos de maneira muito semelhante. Indicando que a semelhança de “background” genético entre as cepas é suficiente para que reconheçam as células como próprias.

Os dados encontrados neste estudo *in vivo* reforçam o que havia sido mostrado nos ensaios de adesão e migração *in vitro*. Sugerindo fortemente que PrPc é um novo receptor de LN envolvido com os processos de adesão e migração celulares. Assim como outros receptores de matriz extracelular, alterações na sua expressão podem fazer com que as células tumorais ganhem vantagens de adesão e migração aumentando seu potencial metastático.

É importante ressaltar que este trabalho abre novas perspectivas com relação aos estudos de moléculas ou marcadores do processo metastático, assim como foi feito quando da caracterização dos receptores clássicos de proteínas de matriz em particular de LN.

Vale dizer que em nenhum momento especulamos estar mostrando a molécula envolvida com processos metastáticos, mas provavelmente um dos atores coadjuvantes neste evento tão intrigante e complexo. Acreditamos sim, que a ampliação do conhecimento do processo ajude a formar uma história que entendida trará muitos benefícios ao tratamento do câncer.

6. CONCLUSÕES

- I) Prion celular é um ligante de LN envolvido com adesão *in vitro* de células normais e tumorais.
- II) Prion celular está envolvido com a migração à LN de células metastáticas *in vitro*.
- III) PrPc participa dos mecanismos de adesão e migração dependentes de LN, mas não dos que dependem de FN.
- IV) O peptídeo γ -1 da LN reproduz os eventos desencadeados pela LN quanto a interação com PrPc, confirmando que ele é o sítio de ligação de PrPc na LN.
- V) A presença de integrina β -1 não é suficiente para desencadear a adesão à LN de células que tiveram o gene do PrPc removido, nas condições experimentais deste trabalho.
- VI) PrPc corrobora para o bloqueio da colonização pulmonar das células NIH3T3 ras .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A. K, Lichtman A, Pober J S. **Cellular and molecular immunology**. Rio de Janeiro: Revinter; 1995. p.366-74: Imunidade aos tumores.

Barry RA, Prusiner SB. Monoclonal antibodies to the cellular and Scrapie prion proteins. **J Infect Dis** 1986; 154:518-21.

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell** 1986; 46:417-28.

Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **FASEB J** 1990; 4:148-60.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72:248-58.

Brentani R. The molecular basis of the metastatic phenotype. **Crit Rev Oncog** 1989; 1:247-60.

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. **Exp Neurol** 1997; 146:104-12.

Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. **Science** 1994; 264:569-71.

Buck C. Adhesion mechanisms controlling cell-cell and cell matrix interactions during the metastatic process. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, editors. **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1995. p.172-96.

Büeller H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, De Armond SJ, et al. Normal Development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Büeller H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell** 1993; 73:1339-47.

Cabral AL, Hays NA, Housley PR, Brentani MM, Martins VR. Repression of glucocorticoid receptor gene transcription by c-Jun. **Mol Cell Endocrinol** 2001; 175: 67-79.



- Cashman NR, Loersche R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, et al. Cellular isoform of the scrapie agent participates in lymphocyte activation. **Cell** 1990; 61:185-92.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and Darwinian selection in tumours: review. **Trends Cell Biol** 1999; 12:M57-M60.
- Chen Li-M, Bailey D, Valle-F C. Association of $\beta 1$ integrin with focal adhesion kinase and paxilin in differentiating schwann cells. **The J Neurosci** 2000; 15: 3776-84.
- Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analyses of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature** 2000; 406:532-5.
- Chammas R, Villa LL. Aspectos celulares e moleculares da progressão tumoral. **Acta Oncol Bras** 1993; 13:17-27.
- Chammas R, Jasiulionis MG, Ventura AM, Travassos LR, Brentani RR. Laminin-binding proteins in EJ-ras-transformed fibroblasts. **Braz J Med Res** 1996; 29:1141-9.
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, et al. Identification of scrapie prion protein specific mRNA in Scrapie, Infected and uninfected brain. **Nature** 1985; 315:331-3.
- Collinge J, Whitting MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature** 1994; 370:295-7.
- Coppolino MG. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int. J. Bioc. & Cell Biology** 2000; 32:171-88.
- Dedhar S, Hanningan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. **Curr Opin Cell Biol** 1996; 8:657-69.
- Engvall E, Ruoslahti E. Binding of soluble form of fibroblast, collagen. **Int J Cancer** 1997; 20:1-5.
- Gehlsen KR, Diller L, Engvall E, Ruoslahti E. The human laminin receptor is a member of cell adhesion receptors. **Science** 1988; 241:1228-9.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. **Science** 1999; 285:1028-32.
- Ginsberg MH, Loftus JC, Plow ER. Cytoadhesion, integrin and platelets. **Thromb Haemost** 1988; 59:1-6.
- Gloet T, Riedmayr S, Sohn HY, Pohl U. The 67-Kda laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. **J Biol Chem** 1999; 4:15996-16002.

Goldmann W, Hunter N, Foster JD. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:2476-80.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral ALB, Veiga SS, 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 neurite behavior following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett** 2000b; 482:257-60.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Harris DA, Falls DL, Johnson FAL, Fischbach GD. A prion like protein from chicken brain copurifies with a acetylcholine receptor inducing activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:7664-7668.

Harris DA, Lele P, Snider WD. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by "in situ" hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:4309-13.

Harris DA, Gorodinsky A, Lehmann S, Moulder K, Shyng SL. Cell biology of the prion protein. **Curr Top Microbiol Immunol** 1996; 207:77-93.

Hocking DC, Sottile J, Longo WPJ. Activation of distinct $\alpha 5 \beta 1$ -mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. **J Cell Biol** 1998; 141:241-53.

Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. Adhesion in cell migration. **Curr Opin Cell Biol** 1995; 7:697-706.

Jasiulionis MG, Chammas R, Ventura AM, Travassos LR, Brentani RR. $\alpha 6 \beta 1$ -integrin, a major cell surface carrier of $\beta 1$ -6 branched oligosaccharides, mediates migration of EJ-ras-transformed fibroblasts on laminin-1 independent of its glycosylation state. **Cancer Res** 1996; 56:1682-989.

Jotti GS. Mechanisms of cancer invasion and metastasis: a review. **J Exp Clin Cancer Res** 1998; 7:2-7.

Karlin KD, Tyeklar Z. Bioinorganic chemistry of cooper, Chapman and Hall 1993.

Kristensson K, Feuerstein B, Taraboulos A, Hyun WC, Prusiner SB, DeArmond SJ. Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. **Neurology** 1993; 43:2335-41.

Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubbebine WH, Prusiner SB, DeArmond SJ. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. **DNA**. 1986; 5:315-24.

Kumar CC. Signaling by integrin receptors. **Oncogene** 1998; 17:1365-73.

Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 22:680-5.

Lee J, Ishihara A, Jacobson K. How do cells move along surfaces? **Trends Cell Biol** 1993; 3:366-70.

Liao YC, Tokes Z, Lim E, Lacked A, Woo CH, Button JD, et al. Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. **Lab Invest** 1987; 57:370-4.

Liesi P, Seppälä I, Trenkner E. Neuronal migration in cerebellar microcultures is NIH by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin. **J Neurosci Res** 1992; 33:170-6.

Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **FASEB J** 1993; 7:737-4.

Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. **Sci Am** 1990; 266:234-41.

Locht C, Chesebro B, Race R, Keith JM. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83:6372-6.

Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. **Brain Res Brain Res Rev** 1997; 23:1-27.

Lukashev ME, Werb Z. ECM: signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. **Trends Cell Biol** 1998; 8:437-659.

Mañes S, Miras E, Gómez-Moutón C, Lacalle RA, Martínez AC. Cells on the move: a dialogue between polarization and motility. **IUBM Life** 2000; 49:89-96.

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

Martins RV, Brentani MM, Housley RP. Attenuation of glucocorticoid receptor levels by the H-ras oncogene. **Endocrine** 1995; 3:305-12.

Martins RV, Graner E, Garcia-Abreu Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

- McKinley MP, Hay B, Lingappa VR, Lieberburg I, Prusiner SB. Developmental expression of prion protein gene in brain. **Dev Biol** 1987; 121:105-10.
- Miura T, Hori IA, Takeuchi H. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. **FEBS Lett** 1996; 396:248-52.
- Mobley WC, Neve RL, Prusiner SB, McKinley MP. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brains. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 85:9811-5.
- Oesh B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold, R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell** 1985; 40:735-46.
- Pasqualini R, Chamone DF, Brentani RR. Determination of the putative binding site for fibronectin on platelet glycoprotein Iib-IIIa complex through a hydrophobic complementary. **J Biol Chem** 1989; 264:14566-70.
- Paullson M, Aumailley M, Deutzmann R, Timpl R, Beck K, Engel J. Laminin-nidogen complex extraction with chelating agents and structural characterization. **Eur J Biochem** 1987; 166:11-9.
- Piotrowicz RS, Orzechowski RP, Nugent DJ, Yamada KY, Kunicki TJ. Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. **J Cell Biol** 1988; 106:1359-64.
- Prusiner SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:13363-83.
- Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP. Further purification and characterization of scrapie prions. **Biochemistry** 1982; 21:6942-50.
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, et al. Scrapie prion aggregate to form amyloid-like birefringent rods. **Cell** 1983; 35:349-58.
- Quaranta V, Jones JCR. The internal affairs of an integrin. **Trends Cell Biol** 1991; 1:2-4.
- Richard-Mouillet S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche J L, Lehmann S, Launay J M, Kellermann O. Signal transduction through prion protein. **Science** 2000; 289: 1925-1928.
- Rivas RJ, Hatten ME. Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. **J Neurosci** 1995; 15:981-9.
- Rowett LH, Pizzey JA, Walsh FS. Intercellular adhesion mediated by neural cell adhesion molecules in transfected 3T3 fibroblasts. **Biochem Soc Trans** 1990; 18:412-4.

Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. **Ann Rev Cell Biol** 1988; 4:229-55.

Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. **Adv Cancer Res** 1999; 76:1-20.

Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. **Nature** 1996; 380:528-31.

Sanches-Madrid F, Nagy J, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha and common beta subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1) and the p150,95 molecule. **J Exp Med** 1983; 158:1785-803.

Schaller M A, Parson J T. review. **Curr Opin Cell Biol** 1994; 6: 705-10.

Sonnenberg A, Modderman PW, Hogervorst F. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. **Nature** 1988; 336:487-9.

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

Stossel TP. On the crawling of animal cells. **Science** 1993; 260:1086-94.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. **Nature** 1990; 346:425-34.

Taylor JM, Richardson A, Parson JT. Modular domain of focal adhesion-associated proteins. **Curr Top Microbiol Immunol** 1998; 228:135-58.

Timpl R, Brown E. The laminins. **Matrix Biol** 1994; 14:275-81.

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

Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. **Eur J Biochem** 1988; 176:21-30.

Von de Mark KE, Jul U. Laminin and its receptor. **Biochem Biophys Acta** 1985; 823:147-6.

Waggoner DJ, Drisaldi B, Bartnikas TB, Casareno RLB, Prohaska JR, Gitlin JD, et al. Brain copper content and cuprozyme activity do not vary with prion protein expression level. **J Biol Chem** 2000; 275:7455-8.

Weissmann C. Molecular biology of prion diseases: review. **Trends Cell Biol** 1994; 4:10-4.

Weissmann C, Aguzzi A Perspectives: neurobiology PrP's double causes trouble. **Science** 1999; 286: 914-5.

Yurchenco PD, O'Rear J. Basal lamina assembly. **Curr Opin Cell Biol** 1994; 6:674-81.

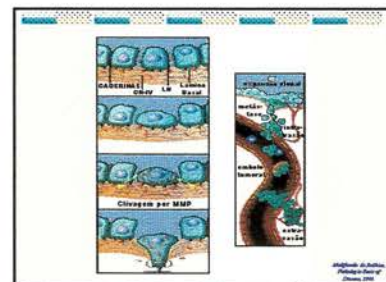
AULA APRESENTADA NA DEFESA



**CENTRO DE PESQUISA E TRATAMENTO
HOSPITAL DO CÂNCER**

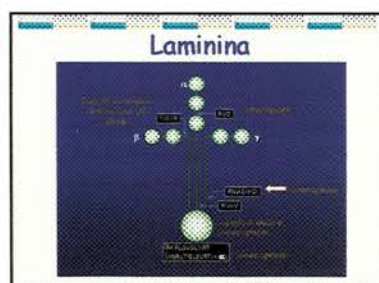
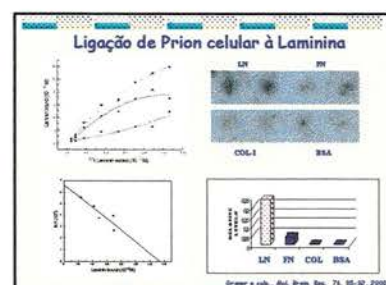
**"Participação da Interação Prion celular-laminina
nos processos de adesão, migração e invasão de
células tumorais"**

**Fátima Mousa
Dra. Vilma Regina Martins.**



Proteína Prion celular liga-se à laminina e medeia neuritogênese.

Graner e cols., Mol. Brain. Res. 76, 85-92, 2000
Graner e cols., FEBS Letters 482:257-260, 2000



PRIONS

Definição: partículas infecciosas protéicas (PRUSINER, 1982).

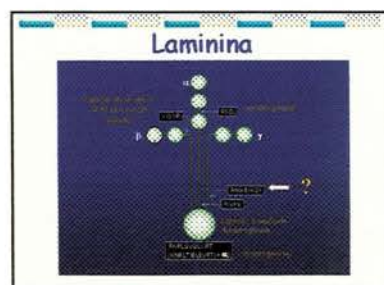
Agentes envolvidos nas encefalopatias espongiformes transmissíveis.



Qual seria a função fisiológica de PrP^C?

Sua localização na superfície celular pode estar relacionada com:

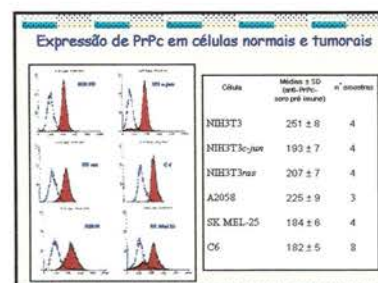
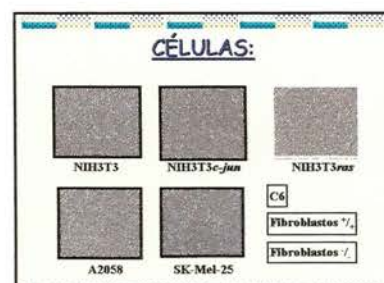
- 1 - Adesão Celular**
- 2 - Sinalização**



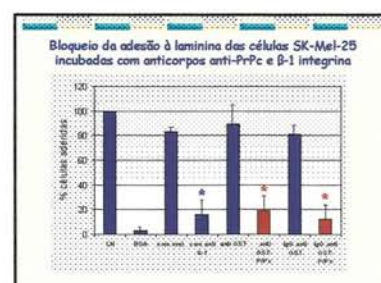
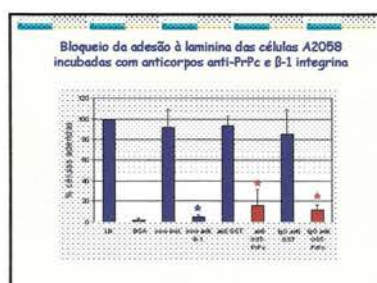
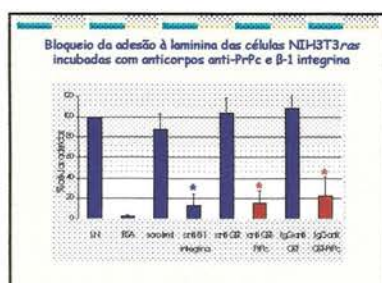
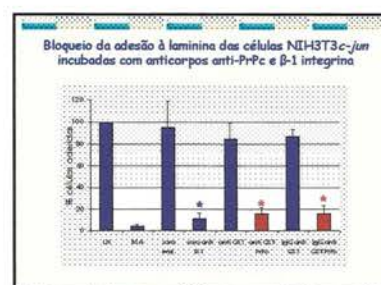
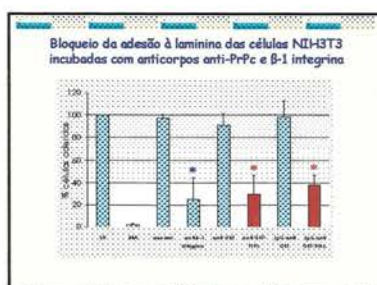
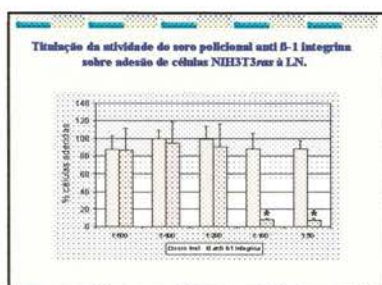
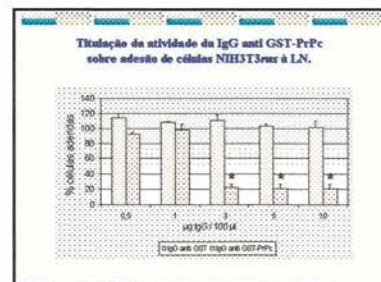
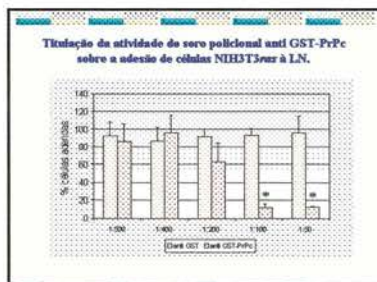
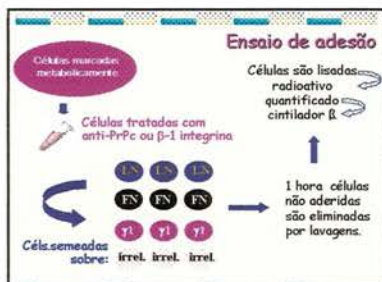
OBJETIVO DO TRABALHO:

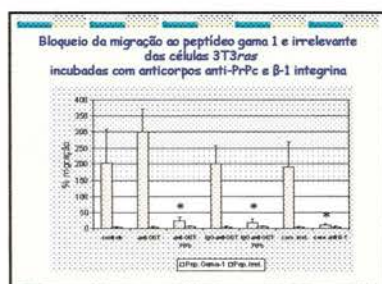
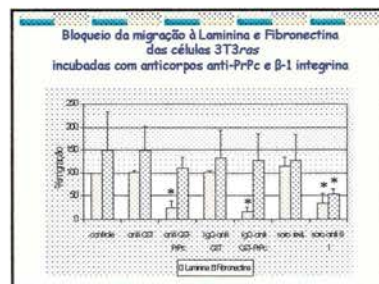
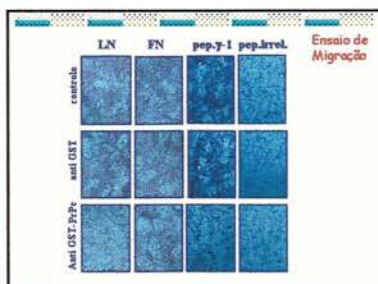
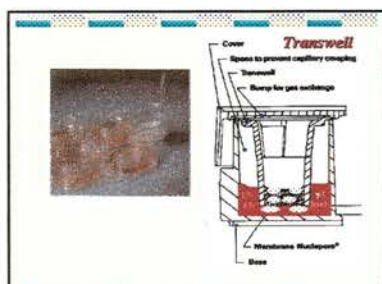
Avaliar a expressão PrP^C em diferentes linhagens normais e tumorais e o seu papel na adesão, migração e colonização pulmonar.

- ### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:
- 1) Quantificar PrP^C em todas as linhagens celulares estudadas por Citometria de Fluxo;
 - 2) Avaliar a capacidade de adesão das células, frente aos substratos LNFN, com ou sem tratamento com os anti-soros PrP^C e β 1 integrins;
 - 3) Avaliar a capacidade migração das células tumorais, frente aos substratos LNFN, com ou sem tratamento com os anti-soros PrP^C e β 1 integrins;
 - 4) Avaliar a capacidade de colonização pulmonar de células tumorais com ou sem bloqueio de PrP^C em camundongos Balb/c e Suícos.



- ### OBJETIVOS:
- 1) Quantificar PrP^C em todas as linhagens celulares estudadas por FACSscan;
 - 2) Avaliar a capacidade de adesão das células, frente aos substratos LNFN, com ou sem tratamento com os anti-soros PrP^C e β 1 integrins;
 - 3) Avaliar a capacidade migração das células tumorais, frente aos substratos LNFN, com ou sem tratamento com os anti-soros PrP^C e β 1 integrins;
 - 4) Avaliar a capacidade de colonização pulmonar de células tumorais com ou sem bloqueio de PrP^C em camundongos Balb/c e Suícos.





- OBJETIVOS:**
- 1) Quantificar PrPc em todas as linhagens celulares estudadas por FACSscan;
 - 2) Avaliar a capacidade de adesão das células, frente aos substratos LMFN, com ou sem tratamento com os anti-soros PrPc e β1 integrina;
 - 3) Avaliar a capacidade migração das células tumorais, frente aos substratos LMFN, com ou sem tratamento com os anti-soros PrPc e β1 integrina;
 - 4) Avaliar a capacidade de colonização pulmonar de células tumorais com ou sem bloqueio de PrPc em camundongos Balb/c e Suíços.



Ensaio de Tumorigênese

Treatment	nr colônias Balb/c	nr colônias Suíço
3T3ras	16 ± 5 (n=23)	13 ± 3 (n=8)
3T3ras + IgG irrelevante	16 ± 5 (n=23)	13 ± 3 (n=8)
3T3ras + IgG anti-PrPc	7 ± 3 (n=23)	5 ± 1 (n=8)
3T3ras + F(ab)2 irrelevante	13 ± 4 (n=5)	12 ± 3 (n=8)
3T3ras + F(ab)2 anti-PrPc	6 ± 2 (n=5)	6 ± 2 (n=8)

a- Balb/c IgG irrelevante X IgG anti-PrPc (p = 0,0003)
b- Balb/c F(ab)2 irrelevante X F(ab)2 anti-PrPc (p = 0,0003)
c- Suíço IgG irrelevante X IgG anti-PrPc (p = 0,0003)
d- Suíço F(ab)2 irrelevante X F(ab)2 anti-PrPc (p = 0,0001)

- CONCLUSÕES:**
- 1- PrPc é um ligante de LN envolvido com a adesão e migração à LN in vitro;
 - 2- PrPc participa dos mecanismos de adesão e migração dependentes de LN mas não de FN;
 - 3- O pep. γ-1 da LN reproduz os eventos desencadeados pela LN quanto à interação com PrPc, confirmando que ele é o provável sítio de ligação de PrPc na LN;
 - 4- A presença de β-1 integrina demonstrou não ser suficiente para desencadear a adesão à LN de células que tiveram o gene de PrPc removido;
 - 5- PrPc participa do processo de colonização pulmonar de células transformadas in vivo.

