

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE PRION
CELULAR EM FENÔMENOS ASSOCIADOS A
TUMORIGÊNESE E METÁSTASE EXPERIMENTAIS**

ANGELITA GONZALEZ MURAS

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2005

Fundação Antonio Prudente
Angela Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Muras, Angelita Gonzalez

**Avaliação da participação de prion celular em fenômenos
associados a tumorigênese e metástase experimentais** / Angelita
Gonzalez Muras – São Paulo, 2005.

137p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. METÁSTASE. 2. PRIONS/fisiologia. 3. ENSAIOS DE
TUMOR EM XENOENXERTO. 4. MIGRAÇÃO CELULAR. 5. INTEGRINAS.

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Laura e Ismael, pelo apoio, exemplo e amor,
Aos meus irmãos, Ismael e David, pela união, amor, apoio e mais,
Ao meu amado filho, Víctor, por iluminar minha vida e revolucionar
meus conhecimentos sobre o amor.**

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Vilma R. Martins**, pela orientação, por seu compromisso com o ensino e pela oportunidade de integrar um dos mais respeitados grupos de pesquisa do Brasil,

Ao **Professor Ricardo R. Brentani**, pela oportunidade e por seus ensinamentos,

Ao **Dr. Roger Chammas**, pelas valiosas co-orientação e sugestões,

Ao **Dr. Luiz Fernando L. Reis**, pela excelência na condução desta pós-graduação e pelo 7 na Capes,

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Molecular: Adriana, Camila, Carolina, Carolina Clarice, Cinthia, Cleiton, Eliane, Fernanda, Gabriel, Gláucia, Kil, Marilene, Michele, Pamela, Rosa, Tatiana, Wanda, Zanith, por todos os momentos compartilhados, amizade, carinho, lições e ajuda,

Aos amigos que criaram asas e voaram: Adriana Mercadante, Beatriz Stolf, Fátima Moussa, Kathleen Kindlmann e Silvio Zanata, pela amizade e ajuda durante os anos de convívio,

À amiga **Roseli Mendonça**, por toda a ajuda, carinho e amizade,

Aos amigos Adriana Abalen, Alex Fiorini, Ana Paula Lepique, Enrique Boccardo, Lara Termini, Laura Sichero, Luciana Gomes, Newton Verbisck, Patrícia Sávio, Vladmir Lima e Waleska Martins, pela amizade, momentos divertidos, reagentes, etc.,

À **Regina Nomizo**, pela importante ajuda nos experimentos de citometria de fluxo,

A todos os funcionários e colegas do Instituto Ludwig, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial para Sra. Conceição, Isabel, Leia, Sr. Eudes, Sampaio, Sr. João, Vanderlei, Ricardo, Eder, Carlos, Miyuki e Suely,

À **FAPESP** pelo apoio financeiro,

À minha família, por toda a ajuda, por todo o amor,

Especialmente, ao meu filho, pelo combustível que me move,

E a Deus, o meu imenso

obrigada!!!

RESUMO

Muras, AG. **Avaliação da participação de prion celular em fenômenos associados a tumorigênese e metástase experimentais.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O prion celular (PrPc) exerce papel fundamental nas encefalopatias espongiformes. No entanto, suas funções fisiológicas ainda não foram totalmente compreendidas. Nosso grupo mostrou, previamente, que PrPc se liga a laminina (LN), uma proteína da matriz extracelular, e que esta interação medeia adesão neuronal, formação e manutenção de neuritos (GRANER et al. 2000a). Sabendo-se que a matriz extracelular e em particular, LN, pode influenciar os processos tumorais e metastáticos, decidimos investigar a possível participação de PrPc nestes eventos. Para tanto, células embrionárias mesenquimais (CEM) de camundongos tipo selvagem (*Prnp^{+/+}*) ou deficientes do gene de PrPc (*Prnp^{0/0}*) foram transfectadas com um vetor que codifica a expressão dos oncogenes *ras* e *myc*. Foram selecionados três clones transformados a partir de cada grupo de células: CEM *Prnp^{+/+} ras/myc* e *Prnp^{0/0} ras/myc*, que possuíam expressão similar de ambas as oncoproteínas. Os clones *Prnp^{+/+} ras/myc* e *Prnp^{0/0} ras/myc* apresentaram tempos de duplicação semelhantes *in vitro*, assim como exibiram doses tumorais mínimas semelhantes quando injetados por via subcutânea no dorso de camundongos tipo selvagem. Os clones *Prnp^{+/+} ras/myc* e *Prnp^{0/0} ras/myc* foram testados em modelo de metástase experimental (colonização pulmonar), injetando-se células na veia lateral da cauda de camundongos tipo selvagem. Após 21 dias, o número de colônias pulmonares presentes na superfície pleural foram quantificados. Os clones *Prnp^{0/0} ras/myc* produziram um número de colônias pulmonares estatisticamente superior ao dos clones *Prnp^{+/+} ras/myc*. Ensaios de esferóides multicelulares mostraram que os clones *Prnp^{0/0} ras/myc* apresentam uma maior adesão célula-célula do que aqueles *Prnp^{+/+} ras/myc*. Entretanto, nenhuma alteração na expressão de ICAM-1 (CD54) ou

caderinas foi encontrada entre eles. Por outro lado, experimentos de imunofluorescência, mostraram que células dos clones *Prnp^{0/0} ras/myc* assim como sua parental CEM *Prnp^{0/0}* apresentam a integrina $\alpha_v\beta_3$ funcionalmente mais ativada do que seus equivalentes *Prnp^{+/+}*. Estes dados sugerem que a ausência de PrPc leva a uma regulação positiva na atividade de $\alpha_v\beta_3$ integrina. Por sua vez, sabe-se que o aumento da atividade desta integrina pode ser responsável pela maior adesão das células tumorais a vitronectina e componentes sanguíneos como as plaquetas, com conseqüente aumento na formação de êmbolos. Desta forma, variações na expressão de PrPc podem contribuir na sinalização celular, em particular naquela envolvida com a ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$, que por sua vez participa na formação de êmbolos e conseqüente aumento na colonização de células tumorais.

SUMMARY

Muras, AG. **Evaluation of prion protein participation in experimental tumorigenesis and metastasis related processes.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The cellular prion (PrP^c) has a critical role in spongiform encephalopathies. However, its physiological functions are not completely understood. We have previously shown that PrP^c binds the extracellular matrix protein, laminin (LN), and this interaction affects neuronal cell adhesion, neurite formation and maintenance (GRANER et al. 2000a). The extracellular matrix and in particular, LN, can affect the tumoral and metastatic processes, therefore we decided to investigate a possible participation of PrP^c in such processes. Thus, mesenchymal embryonic cells from wild-type (*Prnp*^{+/+}) or PrP^c gene ablated mice (*Prnp*^{0/0}) were transfected with a vector containing the expression sequences of *ras* and *myc* oncogenes. We isolated three transformed clones from each genotype (*Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0}) with similar expression of both oncoproteins. *Prnp*^{+/+}*ras/myc* or *Prnp*^{0/0}*ras/myc* clones presented the same doubling time *in vitro* as well as similar minimum tumoral doses when injected subcutaneously in the dorsal region of wild type mice. In lung colonization assays, an experimental model of metastasis, *Prnp*^{+/+}*ras/myc* or *Prnp*^{0/0}*ras/myc* clones were injected in the lateral tail vein of wild-type mice and the number of pulmonary colonies were counted after 21 days. *Prnp*^{0/0}*ras/myc* clones exhibited a significant higher number of lung colonies than those presented by *Prnp*^{+/+}*ras/myc* ones. Multicellular spheroids from *Prnp*^{0/0}*ras/myc* clones showed a higher cell-cell interaction and a lower cellular scattering when compared with the *Prnp*^{+/+}*ras/myc* ones. However, alterations in the expression of ICAM-1 (CD54) and cadherins were not found between the *Prnp*^{0/0}*ras/myc* and *Prnp*^{+/+}*ras/myc* clones. On the other hand, immunofluorescence assays revealed that *Prnp*^{0/0}*ras/myc* clones and the mesenchymal embryonic *Prnp*^{0/0} parental cells presented a higher $\alpha_v\beta_3$ activity when compared to the *Prnp*^{+/+} ones. These data suggest that the

PrPc depletion leads to a positive regulation of $\alpha_v\beta_3$ integrin activity. It is well known that tumoral cell adhesion mediated by $\alpha_v\beta_3$, can mediate tumoral cell adhesion to vitronectin and other blood components, such platelets, increasing embolization capacity. Thus, alterations on PrPc expression can regulate cellular signaling, particularly, that involved in $\alpha_v\beta_3$ integrin activation which participates on cellular embolization and consequently elevation on pulmonar colonization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do vetor <i>ras/myc</i>	40
Figura 2	Determinação da eficiência de crescimento em suspensão de clones celulares derivados de células mesenquimais embrionárias de camundongos selvagens (<i>Prnp^{+/+}</i>) e deficientes para PrPc (<i>Prnp^{0/0}</i>), transfectados com os oncogenes <i>myc</i> e <i>ras</i>	57
Figura 3	Expressão da oncoproteína Ras nos clones de células <i>Prnp^{+/+}</i> e <i>Prnp^{0/0}</i>	60
Figura 4	Expressão da oncoproteína Myc nos clones <i>Prnp^{+/+}</i> e <i>Prnp^{0/0}</i> ..	61
Figura 5	Curvas de crescimento celular dos clones <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i> e respectivos tempos de duplicação (td).....	63
Figura 6	Tumorigênese experimental produzida pelos clones de células <i>Prnp^{+/+}</i> e <i>Prnp^{0/0}</i>	64
Figura 7	Probabilidade de sobrevida livre de tumor após injeção subcutânea de células tumorais <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i> , em camundongos tipo selvagem.....	67
Figura 8	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de tumor após injeção subcutânea de células tumorais <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i> , em camundongos tipo selvagem.....	68
Figura 9	Número de colônias obtidas em experimentos de colonização pulmonar e respectivos intervalos de confiança.....	72
Figura 10	Médias do número de colônias obtidas em experimentos de colonização pulmonar e respectivos intervalos de confiança.....	73
Figura 11	Imunofluorescência para as proteínas de matriz extracelular laminina e fibronectina em culturas de CEM <i>Prnp^{+/+}</i> e <i>Prnp^{0/0}</i> imortalizados.....	75
Figura 12	Atividade de metaloproteinases (gelatinases A e B) nos clones <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i>	77

Figura 13	Fotomicrografia de experimento representativo mostrando esferóides multicelulares, produzidos a partir de clones <i>Prnp^{+/+}</i> e <i>Prnp^{0/0}</i> , cultivados sobre “coating” de proteínas da MEC (FN, LN e VN).....	81
Figura 14	Avaliação do tamanho dos halos formados pelos esferóides multicelulares de clones <i>Prnp^{+/+}</i> e <i>Prnp^{0/0}</i> cultivados sobre proteínas da MEC.....	82
Figura 15	Avaliação do tamanho dos halos formados pelos esferóides multicelulares obtidos a partir do agrupamento dos três clones <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i> cultivados sobre proteínas da MEC.....	83
Figura 16	Citometria de fluxo para detecção de ICAM-1 (CD-54) na superfície celular dos clones <i>Prnp^{0/0}</i> (B3, C5 e E10) e <i>Prnp^{+/+}</i> (T16, U14 e V12).....	85
Figura 17	Avaliação da expressão de caderinas em CEM <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i> imortalizados.....	87
Figura 18	Expressão da subunidade α_v de integrina em fibroblastos de cultura primária de camundongos <i>Prnp^{+/+}</i> e <i>Prnp^{0/0}</i>	90
Figura 19	Quantificação da ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$ por imunofluorescência.....	91
Figura 20	Quantificação da ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$ por imunofluorescência.....	92
Figura 21	Representação esquemática do possível mecanismo de ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$ mediado pela ausência de PrPc.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Histórico das descobertas mais relevantes na biologia dos prions.....	8
Tabela 2	As doenças de prion.....	18
Tabela 3	Principais alterações em PrPc (mutações e inserções) associadas à doenças humanas por prions	19
Tabela 4	Anticorpos primários e secundários empregados em citometria de fluxo para a determinação da expressão de ICAM-1, caderinas e da subunidade α_v de integrinas.....	52
Tabela 5	Clones selecionados.....	58
Tabela 6	Taxa de sobrevivência livre de doença após injeção subcutânea de células tumorais Prnp ^{0/0}	66
Tabela 7	Taxa de sobrevivência livre de doença após injeção subcutânea de células tumorais Prnp ^{+/+}	66
Tabela 8	Número de colônias pulmonares obtidas em experimento de metástase experimental (colonização pulmonar).....	70
Tabela 9	Colonização pulmonar.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina Monofosfato cíclica
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CEM	Células Embrionárias Mesenquimais
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
DMBA	Dimetilbenzantraceno
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FFI	Insônia Familiar Fatal
FN	Fibronectina
FTIR	Fourier Transform Infrared
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GPI	Âncora de Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IgG	Imunoglobulina G
LN	Laminina
LTP	Long Term Potentiation
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEC	Matriz Extracelular

MMP	Metaloproteinase
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
PBS	Tampão Salina Fosfatada
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
<i>Prnp</i>	Gene da Proteína Prion Celular
PrP27-30	Aminoácidos 27 a 30 da Proteína Prion Celular
PrPc	Proteína Prion Celular
PrPres	Proteína Prion Celular Resistente à Proteinase K
PrPsc	Proteína Prion Celular Scrapie
RGD	Tripeptídeo Arginina-Glicina-Asparagina
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Bovino Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Enzima Superóxido Dismutase
TBS/TBST	Tris Buffered Saline/ Tris Buffered Saline Tween
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral β
Tris-HCl	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol, hidrociorado
TSE	Encefalopatia Espongiforme Transmissível
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VN	Vitronectina

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A descoberta de Prion e a “ <i>protein-only</i> ” hypothesis	3
1.3	Doenças priônicas	7
1.2.1	Doenças por prions em animais	9
1.2.2	Doenças por prions em humanos	10
1.4	Biologia da proteína prion celular (PrPc)	20
1.3.1	O gene Prnp e a Estrutura de PrPc	20
1.3.2	Expressão de PrPc	21
1.3.3	Animais deficientes de PrPc	24
1.5	PrPc e seus ligantes	27
1.4.1	PrPc, cobre e estresse oxidativo	27
1.4.2	PrPc e STI1	29
1.4.3	PrPc e vitronectina (VN)	30
1.4.4	PrPc e LN	31
1.5	PrPc e câncer	33
1.6	Modelo de estudo	36
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Cultura de células	38

3.2	Vetor <i>ras-myc</i>	38
3.3	Transfecção celular estável dos oncogenes <i>ras</i> e <i>myc</i>	39
3.4	Ensaio de crescimento em suspensão – ágar mole	41
3.5	Avaliação semi-quantitativa do acúmulo da proteína Ras	42
3.6	Avaliação semi-quantitativa do acúmulo da proteína Myc por imunofluorescência	44
3.7	Ensaio de Tumorigênese	45
3.8	Crescimento celular	45
3.9	Dose Tumoral Mínima	46
3.10	Colonização Pulmonar	46
3.11	Deposição de proteínas da matriz extracelular	48
3.12	Análise da secreção de metaloproteinases	48
3.13	Comportamento de esferóides multicelulares frente a proteínas de matriz extracelular	50
3.14	Expressão de ICAM-1, subunidade α_v de integrina e caderinas	51
3.15	Determinação da atividade de $\alpha_v\beta_3$	52
3.16	Obtenção de proteínas purificadas da matriz extracelular	53
3.16.1	Purificação de laminina	53
3.16.2	Fibronectina e vitronectina	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Caracterização dos clones obtidos	56
4.1.1	Ensaio de crescimento em suspensão – ágar mole	56

4.1.2	Avaliação semi-quantitativa do acúmulo das proteínas Ras e Myc nos clones <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i>	58
4.1.3	Crescimento celular	62
4.2	Ensaio de tumorigênese	62
4.3	Dose tumoral mínima	64
4.4	Colonização pulmonar	67
4.5	Proteínas da matriz extracelular	73
4.6	Secreção de metaloproteinases	76
4.7	Comportamento de esferóides multicelulares produzidos a partir dos clones <i>Prnp^{0/0}</i> e <i>Prnp^{+/+}</i> frente a proteínas da matriz extracelular	77
4.8	Expressão de moléculas de adesão célula-célula	80
4.8.1	Expressão de ICAM-1 (CD-54)	84
4.8.2	Expressão de caderinas	86
4.8.3	A integrina $\alpha_v\beta_3$	83
5	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÕES	116
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
	ANEXOS	
	Anexo 1 Artigo	
	Anexo 2 <i>Curriculum vitae</i>	

1 INTRODUÇÃO

O *scrapie* em ovelhas foi a primeira doença de prion a ser descrita, há mais de 250 anos. Subseqüentemente, um grupo de encefalopatias espongiformes transmissíveis foram descritas em outros animais, incluindo a encefalopatia espongiforme bovina, ou doença da vaca louca, entre outras.

Prions têm sido responsáveis por um século inteiro de episódios trágicos. Há 50 anos, o *kuru* dizimou a população de Papua, na Nova Guiné. Então, a transmissão iatrogênica de prions, através de transplantes e do uso de hormônio de crescimento obtido a partir de cadáveres, causou mais de 250 casos da doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD). Mais recentemente, o uso de ração preparada a partir de carcaças de ovelhas contaminadas, levou ao aparecimento da encefalopatia espongiforme bovina no Reino Unido, trazendo sérios problemas econômicos e a transmissão da encefalopatia espongiforme bovina para humanos, através da ingestão de carne contaminada, o que se tornou um problema de saúde pública (AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

As duas últimas décadas foram de grandes descobertas na área, o que inclui o isolamento do agente infeccioso (a proteína prion), resistente à ação de proteases (BOLTON et al. 1982), a formulação da teoria que explica a transmissão da doença mediada apenas por proteína ou "*protein-only hypothesis*" (PRUSINER 1982), a clonagem do gene *Prnp* e a surpreendente

descoberta de que seu produto é expresso em células normais (OESCH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985; BASLER et al. 1986).

A descoberta do caráter infeccioso dos prions representa a quebra do dogma central da biologia molecular, destituindo os ácidos nucléicos (DNA e RNA) da condição de únicos transmissores de informações hereditárias.

Embora a biologia dos prions represente uma área não totalmente compreendida, muito se sabe sobre doenças priônicas. Portanto, torna-se difícil abordar profundamente todos os aspectos relativos a estes conhecimentos. Assim, uma breve introdução será feita sobre as doenças priônicas, seu mecanismo de transmissão e um histórico das principais descobertas a respeito de prions.

No entanto, o enfoque principal será dado à proteína prion celular (PrP^c), a isoforma normal de prion ou prion scrapie (PrP^{sc}). A função biológica de PrP^c ainda é alvo de estudo intenso, mas esta parece atuar em um amplo número de processos celulares, especialmente importantes no sistema nervoso central, envolvendo proteção contra estresse oxidativo, metabolismo de íons cobre, proteção contra morte celular programada e neuritogênese (GRANER et al. 2000a; CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002; AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

1.1 A DESCOBERTA DE PRION E A “PROTEIN-ONLY” HYPOTHESIS

Fortes evidências apontavam para o caráter infeccioso do *scrapie*, a encefalopatia espongiforme de ovelhas. Índícios vieram do trabalho de CHANDLER em (1971) que transmitiu experimentalmente o *scrapie* para camundongos e de GAJDUSEK et al. (1966), um neurologista que estudava o *kuru*, uma doença humana que ocorreu entre nativos de um povoado da Nova Guiné, conhecido por praticar rituais de canibalismo. O *kuru* é uma doença neurodegenerativa, caracterizada por ataxia cerebelar e subsequente demência, levando o doente à morte dentro de um ano. As surpreendentes similaridades entre o *scrapie* e o *kuru*, especialmente a degeneração espongiforme, sugeriam uma patogênese comum. A transmissão do *kuru* para chimpanzés confirmou o caráter infeccioso da doença.

A hipótese inicial supunha que se tratasse simplesmente de um vírus não convencional, ainda não identificado (GAJDUSEK et al. 1977; DIRINGER et al. 1993). Outra hipótese, sugeria que o agente infeccioso pudesse ser um virino, uma molécula informacional muito pequena, encapsulada por um envoltório protéico, possivelmente sintetizado pelo hospedeiro (KIMBERLIN 1982). A estrutura desse envoltório poderia justificar a preservação do material genético encapsulado frente aos diversos tratamentos que destroem ácidos nucleicos. No entanto, nunca se identificou consistentemente a presença de ácidos nucleicos associados ao agente

infeccioso das TSEs (PRUSINER 1998). Ao contrário, o agente infeccioso mostrou-se resistente a tratamentos que degradam ácidos nucléicos, como irradiação por luz ultravioleta (ALPER et al. 1967). Portanto, pareceu pouco provável que um vírus ou outros agentes convencionais pudessem ser o agente causador dessas enfermidades. Por outro lado, procedimentos que modificavam ou degradavam proteínas (como proteases, SDS e fenol), notavelmente diminuía a infectividade do *scrapie* (PRUSINER et al. 1982). Desta forma, já que a infectividade do *scrapie* estava relacionada a presença de proteína, a procura pelo agente infeccioso intensificou-se.

Quando frações de extratos de cérebro de hamsters infectados por *scrapie* foram enriquecidas (em gradiente de sacarose) e iodinadas, a proteína predominantemente encontrada foi PrP^{Sc} (BOLTON et al. 1982). A partir desse material foi identificada uma proteína que não foi encontrada em fração similar proveniente de cérebros não infectados. Tal proteína migra com peso molecular aparente de 27-30kDa em géis de poliacrilamida/duodecilsulfato de sódio. Sua resistência a digestão com proteinase K a distinguiu de proteínas similares de mesmo peso molecular encontradas em cérebros de animais saudáveis. Além disso, o material mostrou-se semelhante a placas amilóides, altamente insolúvel (birrefringência à luz polarizada após coloração por vermelho Congo). Posteriormente, foi extraído de cérebros de pacientes portadores de doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), material com características semelhantes, do ponto de vista bioquímico e microscópico (PRUSINER et al. 1983). Portanto, todos estes achados sugeriram fortemente a composição exclusivamente

protéica do agente infeccioso envolvido com *scrapie* e com as demais doenças relacionadas (PRUSINER 1982).

Em 1967, GRIFFITH já havia proposto a intrigante hipótese de que o agente responsável pela transmissão da doença pudesse ser uma proteína com a capacidade de se replicar no organismo afetado, sem a participação de material genético – a “*protein only*” hypothesis. Em 1982, STANLEY PRUSINER cunhou o termo “prion”, fazendo uma abreviação a partir da expressão “proteinaceous infectious particle”, para se referir ao singular agente causador das encefalopatias espongiformes transmissíveis.

As partículas infecciosas purificadas foram utilizadas na produção de anticorpos que, surpreendentemente, reconheceram uma proteína de 33-35kDa, presente tanto em cérebro de animais normais como em animais infectados (OESCH et al. 1985; MEYER et al. 1986). Após o seqüenciamento da extremidade aminoterminal desta proteína, foi possível a síntese de peptídeos que foram utilizados como antígenos na produção de anticorpos policlonais em coelhos. Tais anticorpos reagiram com a mesma proteína de 33-35kDa, sugerindo assim que a proteína presente nas partículas infecciosas do *scrapie* estaria presente no cérebro de animais sadios, não infectados (MEYER et al. 1986).

Curiosamente, em extratos purificados de cérebro de animais infectados, o anticorpo produzido contra partículas infecciosas reconheceu uma proteína com peso molecular de 27-30kDa. Descobriu-se mais tarde que PrP27-30, posteriormente denominado de PrPres (proteína prion resistente à proteólise limitada), era resultante do tratamento com proteases

durante a purificação. A remoção, por proteólise parcial, dos primeiros 67 resíduos da extremidade amino-terminal da proteína extraída de cérebros de animais infectados por *scrapie* ou de pacientes com CJD ou síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), reduz seu peso molecular de 33-35kDa para 27-30kDa (OESCH et al. 1985). Além disso, o seqüenciamento dos resíduos da porção amino-terminal de PrP²⁷⁻³⁰ possibilitou a síntese de oligonucleotídeos degenerados e a clonagem de um gene, a partir de bibliotecas de cDNA de hamsters normais e infectados (BASLER et al. 1986). Esse fato comprovou que a partícula infecciosa é realmente codificada por um gene do hospedeiro, o qual se encontra no braço curto do cromossomo 20 do homem e no cromossomo 2 de camundongo (OESCH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985).

Portanto, a proteína denominada PrP^{sc} (prion *scrapie*) parece ser o principal, senão o único, componente, da partícula infecciosa. PrP^c e PrP^{sc} possuem a mesma sequência de aminoácidos e diferem apenas em suas propriedades físico-químicas (MEYER et al. 1986; TURK et al. 1988). Enquanto o PrP^c é solúvel e suscetível à ação de proteases, sua forma anormal, o PrP^{sc} apresenta-se muito insolúvel e resistente à proteólise limitada. Estas propriedades de PrP^{sc} favorecem a formação de agregados insolúveis que se depositam lenta e progressivamente em várias regiões do sistema nervoso, causando a morte celular (CAUGHEY e LANSBURY 2003).

Estudos de modelagem molecular, determinaram que a proteína PrP^c possuía em sua estrutura aproximadamente 40% de α -hélices, e uma pequena quantidade de folha β pregueada (GASSET et al. 1992; PAN et al.

1993). Por outro lado, modelos propostos para PrPsc, sugeriam que a conversão da isoforma normal para a infecciosa ocorria a partir da transformação das α -hélices da região amino-terminal em folhas β (HUANG et al. 1996). O alto conteúdo de folhas β em PrPsc foi predito com base na capacidade de polimerização desta molécula, gerando fibrilas amilóides (PRUSINER et al. 1983), o que foi posteriormente confirmado por estudos em espectroscopia ótica (PRUSINER 1997).

As principais descobertas na pesquisa sobre prions estão sumarizadas na Tabela 1. adaptada por Hajj 2004 (AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

1.2 DOENÇAS POR PRIONS

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) compõem um grupo biologicamente singular de doenças. A degeneração espongiforme, gliose, deposição de material amilóide no sistema nervoso central e extensa morte neuronal (WELLS et al. 1995) são características comuns deste grupo de doenças que têm atingido tanto o homem como animais (Tabela 2) e, embora a etiologia destas doenças tenha permanecido obscura durante muitos anos, sendo atribuída a infecção por vírus ou viróides, sabe-se hoje que elas são causadas pelo acúmulo intra-cerebral progressivo de uma proteína extremamente insolúvel conhecida como prion (PRUSINER 1991, 1997, 1998). As doenças priônicas, que acometem o homem ou animais, são incuráveis e fatais.

Tabela 1 - Histórico das descobertas mais relevantes na biologia dos prions.

Ano	Descoberta
1898	Primeira descrição científica do <i>scrapie</i> (BESNOIT e MOREL 1898)
1920	Primeira descrição científica de CJD (CREUTZFELDT 1920; JAKOB 1921)
1939	Transmissão experimental de <i>scrapie</i> (CUILLE e CHELLE 1939)
1957	Primeira descrição científica do kuru (GAJDUSEK e ZIGAS 1957)
1959	Similaridades entre kuru e <i>scrapie</i> são observadas (HADLOW 1959)
1961	Múltiplas cepas do agente causador do <i>scrapie</i> (PATTISON e MILLSON 1961)
1961	<i>scrapie</i> é transmitido experimentalmente para camundongos (CHANDLER 1961)
1963	Transmissão experimental de kuru para chimpanzés (GAJDUSEK et al. 1966)
1966	Agente do <i>scrapie</i> é resistente à irradiação (ALPER et al. 1966; ALPER et al. 1967)
1967	Hipótese da transmissão através de proteínas (GRIFFITH 1967)
1968	Transmissão de CJD para chimpanzés (GIBBS et al. 1968)
1980	Extrato de <i>scrapie</i> é rico em proteína resistente à digestão (PRUSINER et al. 1980)
1982	Surge o conceito de prion (PRUSINER 1982)
1985	Clonado o gene que codifica PrPc (OESCH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985)
1986	PrPc e PrPsc são codificados pelo mesmo gene (BASLER et al. 1986)
1987	Primeira descrição de BSE (WELLS et al. 1987)
1989	Mutações no gene de PrPc causam GSS (HSIAO et al. 1989)
1992	Construção de camundongo deficiente para PrPc (BUELER et al. 1992)
1993	Camundongos sem PrPc não são infectados por <i>scrapie</i> (BUELER et al. 1993)
1993	Diferenças estruturais entre PrPc e PrPsc (PAN et al. 1993)
1994	Transformação de PrPc em PrPres em sistema acelular (KOCISKO et al. 1994)
1996	Descrição de vCJD (WILL et al. 1996)
1996	PrPsc de BSE possui padrão de glicosilação único (COLLINGE et al. 1996)
1996	NMR de PrPc (RIEK et al. 1996)
1997	vCJD é causado por infecção de BSE (HILL et al. 1997; BRUCE e WILL 1997)
2000	Transmissão experimental de BSE via transfusão de sangue (HOUSTON et al. 2000)
2003	Depleção de PrPc em neurônios reverte sintomas de TSEs (MALLUCCI et al. 2003)
2004	PrPc recombinante pode ser convertido em infeccioso (LEGNAME et al. 2004)

Fonte: HAJJ (2004).

1.2.1 Doenças por prions em animais

O *scrapie*, doença que afeta ovelhas e cabras, tem sido uma preocupação desde o século 19, o que é compreensível considerando-se a importância comercial da lã na indústria têxtil, durante a revolução industrial. A doença se manifesta nos animais acometidos por excitabilidade, coceira e conseqüente queda de pêlos, ataxia e paralisia sendo que, após o aparecimento destes sinais, o curso da doença até a morte do animal é muito curto (NARANG 1987; PRUSINER 1991, 1997).

A encefalopatia espongiforme bovina (BSE) ou “doença da vaca louca” (WELLS et al. 1995) mudou drasticamente a percepção pública das doenças de prion, especialmente na Inglaterra, onde uma epidemia atingiu quase um milhão de cabeças de gado. Após o reconhecimento do BSE, estudos indicaram que a fonte de infecção teria sido a ração oferecida aos animais. Esta era preparada a partir de carne e ossos de ovelhas que, na década de 70, passou por alterações em seu processamento permitindo, possivelmente, que o agente infeccioso do *scrapie* permanecesse ativo contaminando o gado bovino (WILESMITH e WELLS 1991; WILESMITH et al. 1991). O período de incubação da doença é de aproximadamente 5 anos e o gado acometido morre entre duas semanas a seis meses após a detecção dos primeiros sinais clínicos. Entre eles estão excitabilidade e comportamento apreensivo e agressivo, seguidos por alteração de marcha, dificuldade de se levantar, ataxia das patas posteriores e perda de peso.

As alterações histopatológicas assemelham-se às observadas em ovelhas com *scrapie*, com extensa perda neuronal e vacuolização cerebral (PRUSINER 1997).

Outros animais podem desenvolver TSEs, como ruminantes e primatas não humanos, martas (“transmissible mink encephalopathy”), gatos domésticos (WYATT et al. 1991) e outros felinos (“transmissible feline encephalopathies”). Estes casos ficaram restritos a animais em cativeiro e sua origem está claramente relacionada à alimentação e, portanto, à provável contaminação da ração com BSE. Cervos e antílopes selvagens (“chronic wasting disease”) são acometidos por encefalopatias de origem desconhecida, sem conexão epidemiológica com BSE (PRUSINER 1998; SIGURDSON e MILLER 2003).

1.2.2 Doenças por prions em humanos

a) Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar (fCJD)

Esta doença neurodegenerativa humana foi primeiramente relatada por H. G. Creutzfeldt em 1920 e, em 1921, por A. Jakob, citado por MASTERS et al. (1981) e RICHARDSON e MASTERS (1995). Cerca de 14% dos casos de CJD possuem caráter familiar autossômico dominante (MASTERS et al. 1981) sendo, portanto, doença hereditária, com várias alterações genéticas descritas, como diversas mutações pontuais e inserções do octapeptídeo repetitivo do gene codificador de PrP^c (*Prnp*) (Tabela 3).

A fCJD atinge igualmente homens e mulheres, com idade média de 60 anos.

b) CJD iatrogênica (iCJD)

A iCJD pode surgir da transmissão horizontal, invariavelmente relacionada a produtos hospitalares. A iCJD surgiu como uma complicação decorrente de neurocirurgias, transplantes de córnea, transplante e uso terapêutico de *dura mater* humana, tratamento com hormônio do crescimento ou gonadotrofinas cadavéricas e do emprego de eletrodos. Esta forma continua sendo muito rara, com 267 casos reportados até 2000.

A contaminação por inoculação periférica ou por implantes de *dura mater* está associada a manifestações clínicas como ataxia. O período de incubação pode variar de 18 meses a 18 anos, nos casos de transplante de *dura mater*, enquanto que a injeção subcutânea de hormônio de crescimento, vai de 5 a 30 anos. Já a introdução intracerebral direta, inclusive transplantes de córnea, resulta em demência, com períodos de incubação de 16 a 28 meses (COLLINS et al. 2004).

c) Doença de Creutzfeldt-Jakob - forma esporádica (sCJD):

A sCJD assim como sua forma hereditária, fCJD, tipicamente produz demência rápida e progressiva, levando 90% dos doentes à morte dentro de 12 meses. O início da doença ocorre em média aos 60 anos, contrastando com o mal de Alzheimer e com a doença de Parkinson, cuja incidência eleva-se abruptamente com a idade, sCJD exhibe um declínio após os 70 anos de idade (COLLINS et al. 2004)

Ansiedade, distúrbios do sono, perda de peso ocorrem em 40% dos pacientes, dias ou semanas antes do aparecimento dos sinais de distúrbios do sistema nervoso central (SNC). Declínio cognitivo e alterações comportamentais são sinais invariáveis, com movimentos mioclônicos e ataxia cerebelar em 70-80% dos casos (BROWN et al. 1994).

Num subtipo desta doença, os pacientes apresentam degeneração do tálamo, com pequena ou nenhuma alteração espongiforme e insônia freqüente – este perfil clínico foi denominado **insônia esporádica fatal (FSI)** (MASTRIANNI et al. 1999; COLLINS et al. 2004).

A causa desta doença é desconhecida, sendo que nenhuma alteração no gene *Prnp* é encontrada nestes pacientes. Além disso, os indivíduos portadores da forma esporádica de CJD não fazem parte do grupo de risco que tenha recebido algum tipo de transplante, transfusão sanguínea ou que fizeram uso de hormônio de crescimento purificado de pituitárias.

d) CJD variante (vCJD)

Esta enfermidade foi primeiramente identificada em 1996 e estudos bioquímicos, neuropatológicos e de transmissão embasaram a hipótese de que esta forma da doença estaria ligada à encefalopatia espongiforme bovina. COLLINGE et al. em 1996 demonstraram que as partículas infecciosas provenientes destes pacientes possuíam características diferentes daquelas de outras formas de CJD, no entanto, eram semelhantes àquelas causadoras de BSE.

Contrastando com a forma clássica da doença, os pacientes com vCJD são muito mais jovens (a morte ocorre em média aos 29 anos) e, aproximadamente 60% apresentam sintomas psiquiátricos, como ansiedade e insônia. Alterações neurológicas são evidentes, com experiências sensoriais desagradáveis ou dolorosas. Ainda são observadas alterações na locomoção, dificuldades na fala e tremores, aproximadamente 6 meses antes da apresentação de movimentos involuntários. A duração da doença é de 14 meses em média.

O cérebro desses pacientes costuma apresentar altas cargas do agente infeccioso, exibindo placas amilóides circundadas por vacúolos (placas floridas). Todos os casos estudados exibiram metionina em homozigose no códon 129, um achado consistente com o padrão de suscetibilidade encontrado no *kuru*, como descrito mais abaixo (WILL et al. 2000; COLLINS et al. 2004).

No entanto, foi relatado recentemente o aparecimento de um caso de vCJD pré-clínico em paciente que apresentava heterozigose no códon 129, e que recebeu transfusão de sangue de doador que subsequente desenvolveu vCJD. Este caso sugere que a suscetibilidade a vCJD não é restrita a portadores do genótipo em homozigose para metionina no códon 129 (PEDEN et al. 2004).

e) Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

É uma doença rara do SNC, de caráter autossômico dominante, caracterizada por anormalidades motoras e intelectuais. Várias alterações

em *Prnp* estão associadas a esta síndrome (Tabela 3), entre elas a mutação P102L é a mais freqüente.

Os sinais típicos são ataxia cerebelar lenta e progressiva, iniciando por volta da quinta ou sexta década de vida, acompanhada de declínio cognitivo (MASTERS et al. 1981). Ocorre ainda o aparecimento de placas amilóides multicêntricas, sendo este um achado constante, ao contrário da degeneração espongiiforme (MASTERS et al. 1981).

f) Insônia Familiar Fatal (FFI)

O termo insônia familiar fatal foi proposto em 1986 para descrever uma enfermidade que atingiu cinco membros de uma grande família italiana (COLLINS et al. 2004), onde o seqüenciamento do gene *Prnp* revelou mutação no códon 178 (D178N) (MEDORI et al. 1992). Interessantemente, o fenótipo da mutação D178N depende do polimorfismo presente no códon 129. Quando a mutação está associada com metionina na posição 129, o paciente apresenta FFI. Entretanto, a presença de valina em 129 associada a mutação, leva a CJD.

A doença atinge o homem geralmente na quinta década de vida, levando à morte em 13-15 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (MEDORI et al. 1992; MCLEAN et al. 1997), entre eles, perda de peso, letargia e cansaço .

Ocorrem alterações profundas no ciclo de sono e vigília, com insônia proeminente, superatividade simpática, diversas anormalidades endócrinas podem estar presentes, como alteração das oscilações circadianas.

Acredita-se que estes sinais e sintomas estejam relacionados a severa perda do núcleo talâmico, com falha na integração entre o córtex e o tronco cerebral com o sistema límbico e com a rede autônoma central (COLLINS et al. 2004).

g) *Kuru*

O *kuru* surgiu em meados da década de 50, atingindo algumas tribos da Nova Guiné, que praticavam rituais de canibalismo (GAJDUSEK 1977). Além disso, o *kuru* pôde ser transmitido a chimpanzés (GAJDUSEK et al. 1966), confirmando o seu caráter infeccioso.

A doença caracteriza-se por ataxia cerebelar, acompanhada de tremores no tronco, cabeça e extremidades. Subseqüentemente, surgem dificuldades para andar, falar e alterações das funções intelectuais. Alterações emocionais, agressividade e hostilidade, incontinência urinária e fecal e desaparecimento da fala são características das fases mais avançadas da doença, cujo curso clínico é rápido, de aproximadamente 3 a 6 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (GAJDUSEK e ZIGAS 1957)

Do ponto de vista histopatológico, observam-se alterações espongiiformes, astrogliose e deposição de placas amilóides na maioria dos casos, especialmente no cerebelo e no sistema extrapiramidal (GAJDUSEK e ZIGAS 1957; KLATZO et al. 1959).

A presença de metionina em homozigose no códon 129 é um fator determinante de suscetibilidade à doença, elevando o risco de desenvolver o

kuru, com conseqüente diminuição da idade ao aparecimento da doença, diminuição dos tempos de incubação e de duração da doença (CERVENAKOVA et al. 1994; LEE et al. 2001a).

Assim que a prática de canibalismo foi abolida, na última metade da década de 50, a prevalência da doença declinou rapidamente.

h) Doenças Psiquiátricas

Diante da associação entre sintômas psiquiátricos e doenças causadas por prions, nosso grupo procurou investigar se a presença de mutações em *Prnp* poderiam estar associadas com doenças psiquiátricas. Assim, SAMATA et al. (1997) identificaram a substituição de um resíduo de asparagina por uma serina, no códon 171 em *Prnp* (N171S), em indivíduos pertencentes a uma família com alta incidência de doença esquizoafetiva ou esquizofrênica, demonstrando pela primeira vez a associação entre PrPc e doenças psiquiátricas.

i) Epilepsias

Em 1999, nosso grupo demonstrou que animais *Prnp*^{0/0} exibiram sensibilidade aumentada a convulsões quando comparados a animais tipo selvagem (WALZ et al. 1999), o que sugeriu participação de PrPc em processos epiléticos.

Nosso grupo demonstrou em estudos subseqüentes que o polimorfismo no códon N171S do gene *Prnp* é altamente prevalente (23%) em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose

hipocampal, de difícil controle farmacológico. Esta variante não foi encontrada em 200 controles normais. Pacientes que apresentam esse alelo exibiram chance cinco vezes maior de recidiva após a lobectomia temporal em relação àqueles que carregam o alelo normal (WALZ et al. 2003).

Também demonstrou-se que esse mesmo alelo variante está associado a epilepsias decorrentes de diferentes formas de mal-formações do desenvolvimento cortical (WALZ et al. 2004).

Tabela 2 - As doenças de prion.

Doença	Hospedeiro	Mecanismo da patogênese
<i>kuru</i>	Homem	Infecção através de ritual de canibalismo
iCJD	Homem	Infecção por transplantes, hormônio do crescimento, etc.
vCJD	Homem	Infecção por prions bovinos (?)
fCJD	Homem	Mutação germinativa no gene de PrPc
GSS	Homem	Mutação germinativa no gene de PrPc
FFI	Homem	Mutação germinativa no gene de PrPc
sCJD	Homem	Mutação somática no gene de PrPc ou conversão espontânea de PrPc em PrPsc (?)
FSI	Homem	Mutação somática no gene de PrPc ou conversão espontânea de PrPc em PrPsc (?)
<i>scrapie</i>	Ovelhas e cabras	Infecção em ovelhas geneticamente suscetíveis (?)
BSE	Gado	Infecção por ração de origem animal contaminada por prions
TME	Marta	Infecção por prions de gado ou de ovelhas
CWD	Cervos e antílopes	Desconhecido
FSE	Gatos	Infecção por carne contaminada
“Exotic ungulate encephalopathy”	Ungulados	Infecção por ração de origem animal contaminada por prions

Fonte: Adaptado de PRUSINER et al. (1998).

Abreviações: CJD, doença de Creutzfeldt-Jakob; iCJD, CJD iatrogênica; vCJD, CJD nova variante; fCJD, CJD familiar; sCJD, CJD esporádica; GSS, doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker; FFI, insônia familiar fatal; FSI, insônia esporádica fatal; BSE, encefalopatia espongiforme bovina; TME, encefalopatia transmissível do visão; CWD, doença debilitante crônica; FSE, encefalopatia espongiforme felina.

Tabela 3 - Principais alterações em PrPc (mutações e inserções) associadas à doenças humanas por prions.

Códons	Mudanças em PrPc	Doenças associadas	Referências
51-90	Inserção de 48 a 216 pb	CJD/GSS	(GOLDFARB et al. 1993)
102	Pro/Leu	GSS	(DOH-URA et al. 1989)
105	Pro/Leu	GSS	(YAMADA et al. 1993)
117	Ala/Val	GSS	(DOH-URA et al. 1989)
131	Gly/Val	GSS	(PANEGYRES et al. 2001)
145	Tyr/STOP	GSS	(GHETTI et al. 1996)
171	Asn/Ser	Esquizofrenia	(SAMAIA et al. 1997)
178	Asp/Asn	FFI/CJD	(MEDORI et al. 1992)
180	Val/Ile	CJD	(KITAMOTO et al. 1993)
183	Thr/Ala	CJD	(NITRINI et al. 1997)
187	His/Arg	GSS	(CERVENAKOVA et al. 1999)
188	Thr/Lys	Demência	(FINCKH et al. 2000)
196	Glu/Lys	CJD	(PEOC'H et al. 2000)
198	Phe/Ser	GSS	(HSIAO et al. 1992)
200	Glu/Lys	CJD/FFI	(INOUE et al. 1994)
202	Asp/Asn	GSS	(PICCARDO et al. 1998)
208	Arg/His	CJD	(MASTRIANNI et al. 1996)
210	Val/Ile	CJD	(POCCHIARI et al. 1993)
211	Glu/Gln	CJD	(PEOC'H et al. 2000)
212	Gln/Pro	GSS	(PICCARDO et al. 1998)
217	Gln/Arg	GSS	(HSIAO et al. 1992)
232	Met/Arg	CJD	(KITAMOTO et al. 1993)

Fonte: CASTRO (2004).

1.3 BIOLOGIA DA PROTEÍNA PRION CELULAR (PrPc)

1.3.1 O gene *Prnp* e a Estrutura de PrPc

O gene *Prnp* de mamíferos, que codifica a proteína PrPc possui três éxons em camundongos e dois éxons em hamsters e humanos. Entretanto, como um único éxon codifica a proteína em sua totalidade, em mamíferos e aves (aproximadamente 250 aminoácidos), não há possibilidade de que as duas isoformas de PrP, celular e infecciosa, sejam produtos de "splicing" alternativo. Os promotores dos genes de hamsters, camundongos e humanos contêm múltiplas cópias de repetições ricas em GC e são desprovidos de TATA box (BASLER et al. 1986; PRUSINER 1992, 1998).

O gene *Prnp* em humanos foi mapeado no braço curto do cromossomo 20 e em região homóloga do cromossomo 2, em camundongos (SPARKES et al. 1986).

Nosso grupo demonstrou que a atividade do promotor de *Prnp* é altamente dependente da organização da estrutura da cromatina, e esta pode ser ativada por tricostatina A, um inibidor de histona deacetilase. Este tratamento levou a um aumento da expressão do mRNA bem como ao acúmulo de PrPc, indicando que a transcrição do gene pode ser regulada por fatores de transcrição específicos (CABRAL et al. 2002).

A proteína PrPc contém diversos domínios distintos, e pode sofrer uma série de modificações pós-traducionais como adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso (asparagina nas posições 181 e 197, no homem), formação de uma ponte de dissulfeto intramolecular

entre os resíduos de cisteína 179 e 214. Dois peptídeos sinalizadores estão presentes na molécula, um na porção amino-terminal, que é clivado durante a síntese da proteína no interior do retículo endoplasmático rugoso e outro, na porção carboxi-terminal, que permite a ligação da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). No complexo de Golgi, a âncora de GPI é modificada pela adição de um resíduo de ácido siálico. Há ainda uma série de 5 octapeptídeos repetitivos [P(Q/H)GGG(G/-)WGQ] adjacentes, entre os aminoácidos 51 a 91, ricos em glicina e prolina (PRUSINER 1992; KIM et al. 2001).

Através de estudos de FTIR (“Fourier transform infrared”) e de dicroísmo circular, mostrou-se que PrPc contém aproximadamente 40% de estrutura em α -hélice e pequeno conteúdo em folha- β pregueada, enquanto que sua isoforma infecciosa contém 45% de folhas- β e 30% de α -hélices (PAN et al. 1993).

1.3.2 Expressão de PrPc

A expressão de PrPc é absolutamente necessária para a propagação das doenças de prion (BUELER et al. 1993). Esta é ainda de fundamental importância na determinação das taxas de infecção (FISCHER et al. 1996) e das rotas seguidas desde tecidos periféricos até o SNC (GLATZEL e AGUZZI 2000). Portanto, é de grande interesse conhecer o padrão de expressão de PrPc *in vivo*.

Nesse sentido, assim que sondas para o gene *Prnp* tornaram-se disponíveis, pôde-se verificar que PrPc é constitutivamente expresso no

cérebro adulto saudável e altamente regulado durante o desenvolvimento em camundongos (OESCH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985). Na região do septo, a expressão dos mRNAs de *Prnp* e do gene de colina-acetiltransferase se elevam concomitantemente durante o desenvolvimento (MOBLEY et al. 1988). Estudos de hibridação *in situ* em roedores revelaram alta expressão de mRNA de *Prnp* em neurônios (KRETZSCHMAR et al. 1986), células endodimais, epitélio do plexo coróide, astrócitos, células endoteliais e meninges, e em outros tecidos como células pulmonares, músculo cardíaco, que contêm altos níveis de mRNA. Esses dados indicam que mRNA de PrPc é um componente normal de diversos tecidos (BROWN et al. 1990).

A expressão da proteína PrPc no cérebro de hamster mostrou-se mais intensa na região CA1 do hipocampo e virtualmente ausente na camada granular do giro denteado e na camada de células piramidais (DEARMOND et al. 1987; TARABOULOS et al. 1992). Também foi detectada em: estômago, intestinos, pulmão, músculos e rim (FOURNIER et al. 2000).

Em camundongos, utilizando imunistoquímica e hibridação *in situ*, evidenciou-se a expressão de PrPc em diversos tecidos, como no sistema nervoso periférico (corpos celulares de neurônios de gânglios da raiz dorsal, axônios motores e sensoriais e células de Schwann), sistema linforreticular (linfócitos, células dendríticas, etc.), sistema gastro-intestinal (células enteroendócrinas, linfócitos intraepiteliais e miofibroblastos), sistema respiratório (no epitélio olfatório, corpos celulares neuronais, axônios,

dendritos, células globosas e no parênquima pulmonar), sistema urogenital (rim, bexiga urinária, testículos), pele, musculatura lisa, esquelética e cardíaca e glândula supra-renal (FORD et al. 2002).

Em humanos detectou-se PrPc no plasma e em células endoteliais (STARKE et al. 2002; SIMAK et al. 2002), células da medula óssea (BURTHEM et al. 2001; STARKE et al. 2002), queratinócitos (PAMMER et al. 1998), linfócitos e monócitos (LI R et al. 2001), esperma (SHAKED et al. 1999) e enterócitos (MOREL et al. 2004).

Em relação à localização subcelular, a expressão de PrPc está em concordância com sua via secretória: complexo de Golgi, grânulos e vesículas secretórias e membrana plasmática, em diversos tipos celulares (PRUSINER 1991; FOURNIER et al. 2000).

PrPc sofre internalização a partir da membrana plasmática de células em cultura e, na grande maioria das vezes, a proteína recicla e retorna para a membrana plasmática sem ser degradada (SHYNG et al. 1993). Alguns experimentos têm identificado PrPc em organelas endocíticas (SHYNG et al. 1993; LEE et al. 2001b; MAGALHAES et al. 2002) e em vesículas de clatrina (SHYNG et al. 1995; PRADO et al. 2004).

Entretanto, PrPc está presente em “rafts”, domínios de membrana ricos em esfingolipídios e colesterol, onde a maioria das proteínas ancoradas por GPI parece se localizar (MADORE et al. 1999), o que poderia significar que o mecanismo de internalização ocorreria por domínios de membranas tipo cavéolas. Recentemente, propôs-se que PrPc pode usar mais que uma via de internalização (PRADO et al. 2004). O conhecimento dos mecanismos

envolvidos na internalização e reciclagem de PrPc é de grande importância para a compreensão da função fisiológica de PrPc e do mecanismo de conversão para a forma infecciosa (PRADO et al. 2004).

1.3.3 Animais deficientes de PrPc

Para melhor compreender a patogênese e transmissão das encefalopatias espongiformes bem como o papel fisiológico de PrPc, foram gerados animais cujo gene *Prnp* foi removido.

O primeiro camundongo deficiente de PrPc foi gerado pelo grupo de Charles Weissmann, em 1992 (BUELER et al. 1992). Denominado Zurich-1 ou *Prnp*^{0/0} (Zrch-1) e, surpreendentemente, o animal não somente foi viável como inicialmente pareceu completamente normal. A seguir, o mesmo grupo constatou que esses animais eram completamente resistentes à infecção por prions (BUELER et al. 1993).

Alguns anos mais tarde, foram evidenciadas algumas alterações nestes animais como alteração do ritmo circadiano (TOBLER et al. 1996), bloqueio na inibição rápida do receptor GABA_A (ácido γ -aminobutírico tipo A) e diminuição de LTP ("long term potentiation") (COLLINGE et al. 1994). Nosso grupo também descreveu algumas alterações como maior atividade motora (ROESLER et al. 1999), aumento na sensibilidade a agentes epileptogênicos (WALZ et al. 1999) e consolidação prejudicada das memórias de curta e longa durações em animais idosos (COITINHO et al. 2003).

Outra linhagem de animais deficientes gerada posteriormente foi denominada Edinburgh (Edbg) *Prnp*^{-/-} (MANSON et al. 1994), também se mostrou aparentemente normal, de modo que estes animais não foram capazes de levar à elucidação do papel fisiológico de PrPc.

Outras três cepas de camundongos deficientes de PrPc foram geradas (*Prnp*^{-/-} Ngsk, Rcm0 e *Prnp*^{-/-} Zrch-II) com extensas deleções na seqüência que flanqueia a região codificadora de *Prnp*. Estes animais desenvolviam-se normalmente mas, por volta da septuagésima semana de idade, apresentavam perda de células de Purkinje no cerebelo, o que provocava ataxia (SAKAGUCHI et al. 1996; MOORE et al. 1999). Este fenótipo foi inicialmente atribuído à ausência do PrPc, uma vez que a reintrodução de *Prnp* abolia a neurodegeneração nesses animais. No entanto, a discrepância entre estes animais e os gerados inicialmente foi solucionada pela clonagem de um gene localizado 16 kb a 3' do gene de *Prnp*, que corresponde ao gene de uma proteína que foi denominada Doppel (Dpl – “downstream of the *Prnp* locus”), cuja função ainda é desconhecida (MOORE et al. 1999). Nestas linhagens de animais que desenvolvem ataxia, um “splicing” intergênico com o gene *Prnp* gera um transcrito quimérico que está sob o controle do promotor de *Prnp*, levando à expressão de altas concentrações da quimera no cérebro. Portanto, sugerindo que a superexpressão de Dpl – e não a ausência de PrPc – é a causa da neurodegeneração nestes animais (MOORE et al. 1999).

Para estabelecer o papel neurodegenerativo de Dpl, seu gene foi interrompido em camundongos Zurich II. Estes animais não desenvolveram

ataxia, confirmando que este fenótipo é causado pela alta expressão de Dpl e não pela retirada de PrPc (GENOUD et al. 2004).

Foi ainda gerado um camundongo onde a expressão de PrPc é abolida apenas em neurônios, no período pós-natal, usando o sistema *Cre-lox*. Estes animais permitiram a avaliação dos efeitos da deleção de PrPc na sobrevivência neuronal e funcionalidade do cérebro adulto. Os animais mostraram-se saudáveis, sem evidência de neurodegeneração por até 15 meses após a deleção do gene de PrPc. Entretanto, avaliação neurofisiológica revelou significativa redução dos potenciais de hiperpolarização tardia (AHPs) em células da região CA1 do hipocampo, sugerindo que PrPc exerça papel na modulação da excitabilidade neuronal (MALLUCCI et al. 2002).

A depleção neuronal de PrPc nesses animais foi capaz ainda de reverter o quadro de infecção neuroinvasiva por prions, revertendo alterações espongiiformes precoces, perda neuronal e progressão para a fase clínica da doença. Isto ocorreu a despeito do acúmulo extraneuronal de PrPsc (particularmente nas células da glia). Portanto, a propagação de PrPsc não neuronal não é patogênica e o bloqueio da conversão de PrPc em PrPsc no interior dos neurônios, durante a infecção por *scrapie*, previne sua neurotoxicidade (MALLUCCI et al. 2003).

1.4 PrPc E SEUS LIGANTES

Embora diversos ligantes de PrPc tenham sido reportados nos últimos anos, o significado biológico da maioria dessas interações permanece obscuro (LEE et al. 2003).

Por outro lado, a identificação de ligantes específicos de PrPc levaram à demonstração de sua participação em processos biológicos importantes. Entre os ligantes de PrPc estão os glicosaminoglicanos (PAN et al. 2002), e o receptor de laminina (GAUCZYNSKI et al. 2001), que foram relacionados ao processo de internalização de PrPc.

Ligantes de maior relevância para este trabalho estão descritos mais detalhadamente a seguir.

1.4.1 PrPc, cobre e estresse oxidativo

Sabe-se que PrPc associa-se a íons cobre através de resíduos de histidina contidos na região dos “octarepeats”. A interação PrPc-Cu²⁺ é importante na estabilização estrutural da molécula, além de estar envolvida na proteção contra o estresse oxidativo (MIURA et al. 1996; BROWN et al. 1997a).

A molécula de PrPc é internada em resposta à adição de íons cobre (PAULY e HARRIS 1998) e acumula-se na região perinuclear e no complexo de golgi em neurônios do tipo selvagem (*Prnp*^{+/+}), estes exibem expressão de PrPc aumentada (HIJAZI et al. 2003) e também uma rápida endocitose da proteína (BROWN e MOHN 1999; LEE et al. 2001b).

Sinaptossomas purificados a partir de cérebros de camundongos deficientes para PrPc contêm substancialmente menos cobre que o encontrado em animais tipo selvagem (BROWN 2003). Alterações na concentração de cobre levam a distúrbios na atividade de receptores, como a inibição de receptores de GABA ou a redução de LTP (“long term potentiation”) (GABRIELSSON et al. 1986; VLACHOVA et al. 1996). Em concordância com esses dados, animais *Prnp*^{0/0} estudados eletrofisiologicamente apresentaram LTP alterada e inibição dos receptores GABAérgicos (COLLINGE et al. 1994).

Outras evidências de interação entre PrPc e cobre em neurônios vêm de estudos empregando culturas de células cerebelares. Verificou-se que células cerebelares de animais tipo selvagem retêm mais cobre que aquelas deficientes para PrPc (BROWN et al. 1997a). Essa diferença, no entanto, pode ser abolida se PrPc é removido da superfície celular (BROWN 1999).

Estudos empregando PrPc recombinante, de camundongo e galinha, mostraram que PrPc ligado especificamente através dos “octarepeats” a, no mínimo, dois átomos de cobre exibe atividade semelhante a SOD (superóxido dismutase). Além disso, a imunodepleção de PrPc em extratos de cérebro de camundongo diminui a atividade SOD apresentada por essas preparações. Isto pode significar que PrPc atue na detoxificação de superóxidos, prevenindo a ocorrência de danos causados pelo estresse oxidativo (WONG et al. 2000).

1.4.2 PrPc e STI1

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 deveria envolver um ligante ou receptor. Este promoveria tanto a conexão entre PrPc/PrPsc e a maquinaria de internalização, quanto poderia participar da conversão de PrPc em PrPsc (HARRIS et al. 1996). Estudos, realizados por PAULY e HARRIS (1998), sugerem que íons cobre poderiam alterar a conformação de PrPc, aumentando sua afinidade por um possível receptor (PAULY e HARRIS 1998).

Nosso grupo caracterizou uma proteína ligante de PrPc presente na superfície de neurônios e células da glia. O bloqueio desta proteína com anticorpos específicos inibe a neurotoxicidade do peptídeo 106-126 de prion humano sobre culturas primárias de neurônios hipocámpais de rato. Desta forma, sugeriu-se que este ligante estivesse envolvido tanto nos processos fisiológicos mediados por PrPc como no mecanismo de infecção desencadeado por prions (MARTINS et al. 1997). Este receptor/ligante mostrou identidade total com a proteína *stress inducible protein 1* (STI1) (ZANATA et al. 2002), uma co-chaperonina que participa de um complexo macromolecular envolvendo as proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp90 (NICOLET e CRAIG 1989). A proteína humana homóloga a STI-1 é chamada de Hop ("human heat shock cognate protein 70/heat shock protein 90-organizing protein"). Como a expressão desta proteína encontrava-se aumentada em células transformadas pelo vírus SV-40, foi sugerido que esta

possa ter um papel importante na proliferação e regulação gênica (HONORE et al. 1992; BLATCH et al. 1997).

O grupo caracterizou ainda que a interação PrPc-STI1, transduz sinais neuroprotetores, ativando as vias AMPc/PKA e MAPK, resgatando neurônios pós-mitóticos da camada neuroblástica de explantes de retina da morte celular programada (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002). Deste modo, há fortes evidências de que PrPc e seus ligantes possam compor um complexo supramolecular que altere vias de sinalização, estímulos de sobrevivência e proliferação.

1.4.3 PrPc e vitronectina (VN)

A VN é um componente multifuncional presente no plasma e participa da regulação do sistema imune e na coagulação sangüínea (PREISSNER e JENNE 1991; MILIS et al. 1993; SHEEHAN et al. 1995). Esta liga-se a heparina, ao complexo trombina-antitrombina e a inibidores de serino-proteases, sugerindo um papel modulatório da MEC (MARTINEZ-MORALES et al. 1995). Além disso, VN interage com outros elementos da MEC, como colágeno e glicosaminoglicanas (HAYMAN et al. 1983; GEBB et al. 1986). Por outro lado, conecta-se à membrana celular através das integrinas, especialmente as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, presentes em plaquetas e megacariócitos e $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, encontradas em vários tipos celulares (FELDING-HABERMANN e CHERESH 1993).

O grupo demonstrou que PrPc liga-se com alta afinidade a VN ($k_d=1,2 \times 10^{-8}M$) e que VN estimula crescimento axonal em neurônios de

gânglios da raiz dorsal, o que é mediado ao menos em parte por PrPc (HAJJ et al. submetido). É interessante o fato de que o peptídeo de VN que se liga a PrPc é capaz de reproduzir os efeitos mediados pela VN inteira em animais tipo selvagem mas não nos deficientes de PrPc. Estes dados sugerem fortemente que PrPc é o único ligante que interage no domínio mapeado na VN, que compreende os aminoácidos 307 a 320 da molécula de origem murina (HAJJ et al. submetido).

Outro dado interessante refere-se ao fato de neurônios de gânglios da raiz dorsal provenientes de animais deficientes para PrPc serem mais responsivos, que aqueles do tipo selvagem, à neuritogênese induzida pelo peptídeo RGD, domínio presente na VN que se liga a integrinas (HAJJ et al. submetido). Esta observação experimental deu margem à hipótese de que neurônios oriundos de animais deficientes para PrPc poderiam compensar a ausência de PrPc, por exemplo, através de integrinas. De fato, confirmou-se que nos neurônios de animais deficientes para PrPc a integrina $\alpha_v\beta_3$ está 30% mais ativada do que aquela presente em animais tipo selvagem (HAJJ et al. submetido). Portanto, as integrinas podem participar da redundância molecular que, por mecanismos compensatórios, pode ser responsável pela prevenção de alterações do sistema nervoso causadas pela ausência de PrPc.

1.4.4 PrPc e LN

Laminina (LN), o principal componente não colagênico da membrana basal, é uma glicoproteína de cerca de 800 kDa composta de duas cadeias

polipeptídicas curtas e uma longa, que se arranjam em forma de cruz, tendo um papel crucial em diversos processos celulares como diferenciação, migração e sobrevivência. Foram descritos 15 tipos de lamininas em mamíferos, sendo a cadeia γ -1 presente em pelo menos dez deles, com exceção das lamininas 5 e 12 (TIMPL e BROWN 1994; COLOGNATO e YURCHENCO 2000; SASAKI et al. 2004).

O grupo caracterizou uma interação específica entre LN e PrPc, que exibe uma constante de afinidade de 10^{-8} M (GRANER et al. 2000a). Esta ocorre entre os aminoácidos 173-183 de PrPc murino (LOPES et al. submetido) e o decapeptídeo RNIAEIIKDI presente no domínio carboxi-terminal da cadeia γ -1 da laminina (GRANER et al. 2000a e b). A ligação entre PrPc e a cadeia γ -1 da laminina está relacionada a adesão celular e à gênese e manutenção de neuritos na linhagem celular neuronal PC-12 e em neurônios de culturas primárias de ratos e camundongos (GRANER et al. 2000a e b).

Sabe-se que os aminoácidos KDI presentes no decapeptídeo RNIAEIIKDI da cadeia γ -1 de LN constituem um domínio ativo responsável pelo crescimento de neuritos, migração neuronal e regeneração do sistema nervoso, (LIESI et al. 2001; LIEBKIND et al. 2003; WIKSTEN et al. 2003). No entanto, o ligante de LN responsável por estes efeitos não havia sido identificado mas, nossos dados evidenciam PrPc como provável único ligante para esta região da molécula de LN (GRANER et al. 2000a).

Nosso grupo demonstrou ainda que uma diminuição na retenção das memórias de curta e longa duração pode ser causada pelo bloqueio de PrPc

e LN no hipocampo. Além disso, a participação do complexo PrPc-LN neste evento envolve sinalização por MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) e PKA (proteína quinase A) dependente de AMP cíclico (COITINHO et al. em preparação).

Uma vez que PrPc é uma proteína constituinte de vários tipos celulares, é provável que sua função fisiológica não esteja restrita apenas ao processo de plasticidade neuronal. O fato desta associar-se à laminina num domínio específico da cadeia γ -1, presente em quase todos os tipos de laminina conhecidos (TIMPL e BROWN 1994) pode ser uma forte evidência de que o complexo PrPc-LN possa atuar em outros eventos fisiológicos ou patológicos.

1.5 PrPc E CÂNCER

A MEC é composta de várias macromoléculas capazes de regular diversas funções celulares. Ela pode agir influenciando a diferenciação, proliferação, adesão e migração celulares, dependendo do tipo de célula e do tecido e sua regulação pode ser orquestrada por fatores de crescimento e por hormônios (LIN e BISSELL 1993; LUKASHEV e WERB 1998).

A LN é um dos principais componentes da MEC, atuando em fenômenos de adesão e migração de um grande número de linhagens celulares formação de capilares a partir de células endoteliais (GRANT et al. 1989; MALINDA et al. 1999) além de ser um fator quimiotático nos processos de migração e metástase de células tumorais (KRAMER et al.

1986; RAMOS et al. 1991). As interações entre as células e a MEC podem estar total ou parcialmente alteradas nas neoplasias, influenciando a proliferação e a invasão de células tumorais (DEDHAR e HANNIGAN 1996). As células tumorais podem permear a membrana basal e atravessar o estroma, atingindo a circulação sanguínea e/ou linfática e, então, disseminar à distância, gerando metástases.

Os processos de adesão e migração celulares são essenciais para a disseminação tumoral e para a invasão da matriz extracelular durante o processo metastático. Este é em geral regulado por interações específicas entre componentes da matriz extracelular, em particular laminina, com receptores específicos da superfície da célula (LUCKENBILL-EDDS 1997).

As integrinas são os principais receptores para laminina e outras moléculas de matriz extracelular, sendo compostas por duas subunidades, α e β . Estas moléculas estão envolvidas em diversos fenômenos fisiológicos, entre eles adesão e migração celulares, formação de contatos focais e sinalização (HYNES 1992 e 2002). Algumas integrinas capazes de interagir com LN são $\alpha_1\beta_1$ (TOMASELLI et al. 1990), $\alpha_3\beta_1$ (GEHLSSEN et al. 1992; TASHIRO et al. 1999; SHANG et al. 2001); $\alpha_6\beta_1$ (SONNENBERG et al. 1991), $\alpha_v\beta_3$ (SASAKI et al. 2001). Também foi descrita a ligação de $\alpha_v\beta_3$ e de $\alpha_5\beta_1$ na cadeia γ -1 da laminina (PONCE et al. 2001).

Dados obtidos pelo nosso grupo mostram que fibroblastos transformados com o oncogene *ras*, tratados com anticorpos específicos contra PrPc, apresentam uma inibição de 80% na adesão e migração dependente de laminina. Cabe ressaltar que esta inibição ocorre

especificamente quando LN é usada como substrato, não ocorrendo na presença de FN (fibronectina) (MOUSSA 2001).

É possível, portanto, supor que a interação PrPc-LN possa modular eventos importantes relacionados ao processo tumoral onde a adesão célula-célula e célula-matriz são fundamentais. Além da interação PrPc-LN, sabe-se que PrPc interage com outros componentes da MEC ou relacionados a ela, como glicosaminoglicanos (PAN et al. 2002) e vitronectina (HAJJ et al. submetido) e receptor de LN (GAUCZYNSKI et al. 2001).

Alguns estudos têm associado PrPc e câncer. Um trabalho recente mostrou que linhagem de células de carcinoma gástrico resistente a doxorrubicina exibem expressão aumentada de PrPc. Além disso, empregando a tecnologia de RNAi para reduzir a expressão de PrPc, reverteu-se parcialmente a resistência dessa linhagem à droga antineoplásica (DU et al. 2005).

Outro trabalho demonstrou que a expressão do gene de PrPc é 17 vezes maior em linhagem celular tumoral resistente a TNF- α quando comparada com a linhagem controle, sensível a TNF- α (DIARRA-MEHRPOUR et al. 2004). Este achado reflete-se também no acúmulo da proteína PrPc. Foi possível ainda verificar que a superexpressão de PrPc na linhagem sensível a TNF- α (fator de necrose tumoral tipo α) torna-a resistente a esta citocina.

1.6 MODELO DE ESTUDO

Sabe-se que a natureza da tumorigênese (múltiplos passos) reflete-se na ativação consecutiva de vários oncogenes. Em concordância com essa hipótese, muitos tumores humanos e linhagens celulares tumorais apresentam dois oncogenes ativados, representando principalmente as famílias *ras* e *myc* (THOMPSON et al. 1989; COMPERE et al. 1989).

Este estudo teve como objetivos avaliar a participação de PrPc na proliferação tumoral *in vitro* e e tumorigênese *in vivo*, na modulação da interação célula-célula e célula-matriz, na ativação de metaloproteinases e na sua participação no processo de colonização pulmonar, aspectos estes de grande relevância em tumorigênese e metástase. Portanto, foi do nosso interesse determinar de que forma a expressão ou não de PrPc pode contribuir nesses processos patológicos.

Assim, julgamos que a geração de células transformadas com os oncogenes *ras* e *myc* e que expressam ou não a proteína PrPc são uma ferramenta fundamental para este estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Culturas primárias de células embrionárias mesenquimais (CEM) (FRESHNEY 1987) foram obtidas a partir de células de embriões de 14 dias de camundongos tipo selvagem, *Prnp*^{+/+} (obtidos a partir do cruzamento de descendentes da primeira geração resultante do acasalamento entre 129/SV e C57BL/6J) ou de camundongos cujo gene de PrPc foi removido, *Prnp*^{0/0} (BUELER et al. 1992) e foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%. Estas células foram imortalizadas por sucessivas passagens em cultura, até que se obteve no mínimo um clone que permaneceu em cultura após a 70ª passagem (FRESHNEY 1987).

3.2 VETOR *ras - myc*

O vetor pBR-322 recebeu a construção representada na Figura 1 (THOMPSON et al. 1989; COMPERE et al. 1989), que possui os oncogenes *v-Ha-ras* e *v-gag-myc*, de origem viral.. O gene *v-Ha-ras* ativado, está contido entre dois sítios de restrição para a enzima *Bam HI*, enquanto que um fragmento do DNA do vírus MC29 ("avian myelocytomatosis virus"), contendo o oncogene *v-gag-myc*, foi clonado entre dois sítios de restrição

para *Bgl II*. A transcrição dos oncogenes *v-Ha-ras* e *v-gag-myc* está sob a promoção do LTR ("long terminal repeat") de vírus Moloney de leucemia murina.

O vetor possui ainda o gene de resistência à droga G418, que permite a seleção de clones celulares que receberam a construção, sob controle do promotor de SV- 40.

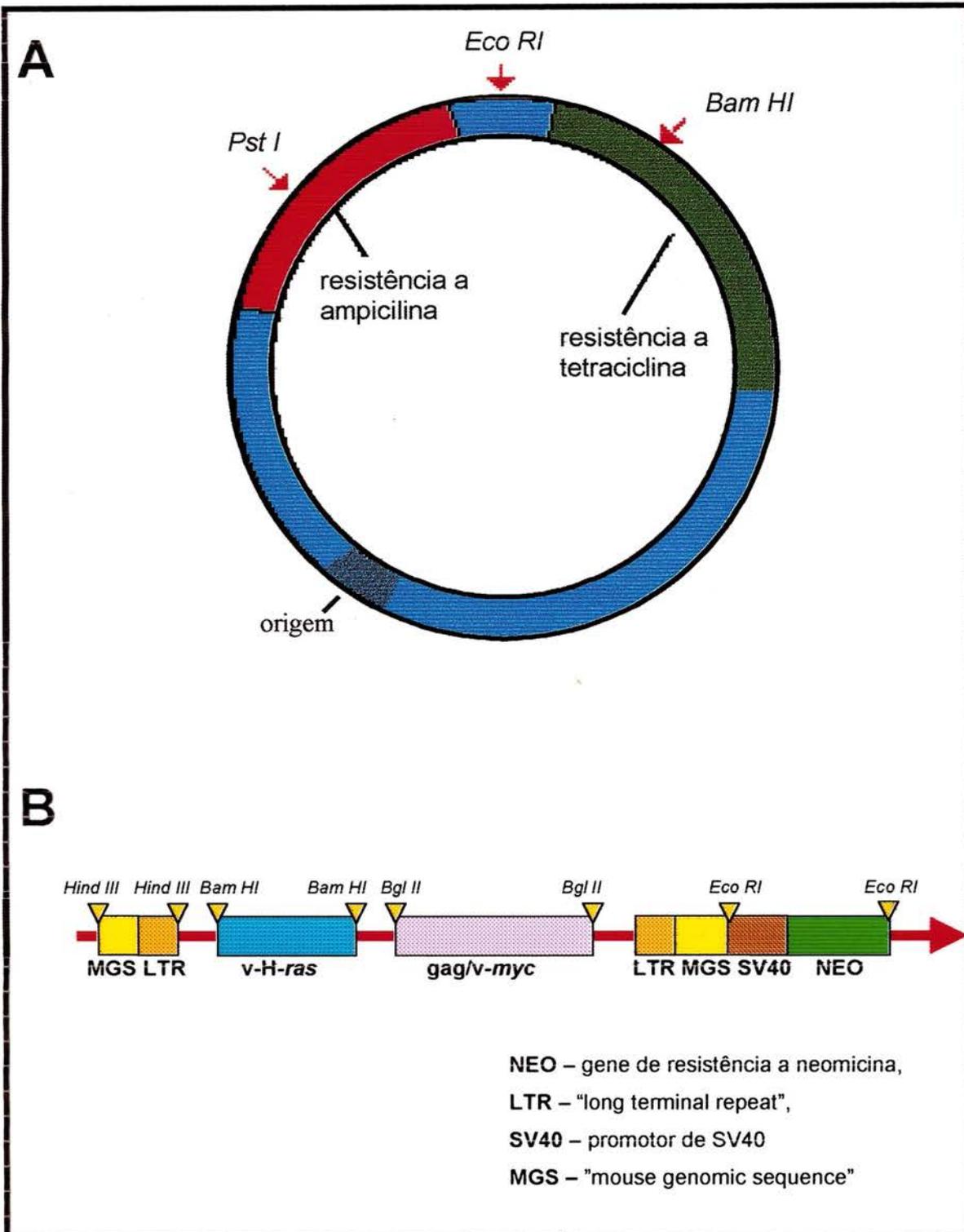
3.3 TRANSFEÇÃO CELULAR ESTÁVEL DOS ONCOGENES *ras*

E *myc*

As CEMs imortalizadas de camundongos *Prnp^{0/0}* ou *Prnp^{+/+}* receberam os oncogenes *ras* e *myc* de origem viral, através da transfecção da construção representada na Figura 1 (THOMPSON et al. 1989; COMPERE et al. 1989), que introduz os oncogenes *ras* e *myc* virais no genoma das células. O DNA do vetor contendo os oncogenes *ras* e *myc* foi introduzido na célula por precipitação com fosfato de cálcio, conforme descrito por (CHEN e OKAYAMA 1988).

As células foram cultivadas no dia anterior ao da transfecção de modo que, no dia da transfecção, as células estivessem em 60-70% de confluência, em placas de cultura de 100mm de diâmetro (Corning).

O DNA a ser transfectado (30µg) foi diluído em 450µl de água estéril e 50µl de solução 2,5M de CaCl₂. A seguir, 500µl de tampão 2xHeBs (0,28M NaCl, 50mM HEPES, 1,48mM Na₂HPO₄, pH7,05) foram adicionados à



Legenda: Plasmídeo recombinante (A) e a construção (B - inserto) contendo os oncogenes *ras* e *myc*.

Figura 1 - Representação do vetor *ras/myc*.

solução contendo o DNA, gota a gota e sob agitação lenta. Após incubação de 20 minutos a temperatura ambiente, a suspensão que se formou foi adicionada às placas de cultura, respeitando-se a proporção de 1 parte da suspensão para cada 9 partes de meio de cultura presente em cada placa. As células permaneceram em presença da suspensão contendo DNA por 16 horas, a 37°C. Após este período, as células foram submetidas a um choque de glicerol (DMEM contendo glicerol a 10%) por 60 segundos.

Após 48 horas do início da transfecção, as células foram repicadas e selecionadas pelo do tratamento com o antibiótico Geneticin - G418 (Gibco BRL/Life Technologies), na concentração de 0,8 mg/ml de meio de cultura, durante 7 dias. Os clones resistentes ao antibiótico foram isolados e analisados.

3.4 ENSAIO DE CRESCIMENTO EM SUSPENSÃO – ÁGAR MOLE

As células dos clones obtidos e as células parentais, descritas no item 3.1, foram submetidas a cultura em suspensão. Para tanto, preparou-se gel de agarose a 0,8% (20ml de agarose “low melting point” a 4% (Gibco), 50ml de meio de cultura DMEM duas vezes concentrado, 10ml de soro fetal bovino e água suficiente para 100ml) em placa de 24 poços, sendo que cada poço recebeu 1ml do gel fundido. A seguir, foram semeadas 100 células sobre a camada de gel previamente gelificada. Finalmente, as células foram recobertas com nova camada de gel de agarose a 0,4% (10ml de agarose “low melting point” a 4% (Gibco), 50ml de meio de cultura DMEM duas vezes

concentrado, 10ml de SFB e água suficiente para 100ml). Após a gelificação, os poços receberam 300µl de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, o que foi repetido a cada 48h, durante 14 dias, quando as células foram fixadas com solução de formol a 3,5% (Merck).

3.5 AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DO ACÚMULO DA PROTEÍNA Ras

Foram preparados extratos totais de células a partir dos clones gerados, lisando 10^6 células em 50µl de tampão de amostra redutor 4x (240mM Tris-HCl (Invitrogen), 0,8% SDS, 200mM β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,01% de azul de bromofenol). Estes foram submetidos a separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 15% em condições denaturantes e posterior transferência para membranas de nitrocelulose (0,45µm – Schleicher & Schuell) durante uma hora sob corrente constante de $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ no sistema Novablot (Pharmacia) em tampão de transferência (39mM glicina, 48mM Tris, SDS a 0,037% e metanol a 20%).

As membranas foram bloqueadas durante 3 horas com TBST (120mM NaCl, 20mM TRIS e 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-p21^{ras}, na concentração de 10µg/ml, obtido a partir do hibridoma de rato Y13-259 (ATCC), cedido gentilmente por Dr. Hugo Armelin. O anticorpo foi diluído em TBST acrescido de leite desnatado a 4% e incubado a 4°C, durante 16 horas. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST, durante

dez minutos e incubadas com anticorpo secundário contra IgG de rato feito em coelho (cedido gentilmente pelo Dr. Hugo Armelin) na diluição de 1:2000 em TBST contendo leite a 2,5%, seguida do anticorpo terciário contra IgG de coelho acoplada a peroxidase, na diluição de 1:3000 (Amershan).

A carga protéica foi normalizada a partir do uso do mesmo número de células no preparo dos extratos. Também se realizou reação de “immunoblotting” para actina nas mesmas membranas, como controle, empregando IgG de coelho anti-actina (Sigma – A5060), na diluição de 1:250 em TBST contendo 2% de leite desnatado. Após três lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário, contra IgG de coelho, marcado com peroxidase (Amershan), na diluição de 1:3000 em TBST. Ambas as reações foram reveladas pelo emprego do “kit” “ECL Western Blotting analysis system” (Amersham). Filmes radiográficos (Hyperfilm – Amershan) foram expostos às membranas.

A seguir, os autorradiogramas obtidos após a revelação das reações de “immunoblotting” foram submetidos a análise densitométrica, empregando-se o “software” Scion Image (National Institutes of Health).

Os valores desitométricos obtidos para a expressão da proteína Ras foram divididos pelo valor correspondente ao obtido para a expressão de actina. Foi atribuído o valor unitário à célula CEM *Prnp*^{+/+}.

3.6 AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DO ACÚMULO DA PROTEÍNA Myc POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram cultivadas em lamínulas de vidro em DMEM acrescido de 10% de SFB e, ao atingirem 70% de confluência, foram lavadas com PBS e fixadas em formaldeído a 3,7%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A seguir, as células foram permeabilizadas com solução de PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,052M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,37M, NaCl 0,12mM) contendo 1% de NP40 (Sigma), por 20 minutos, bloqueadas com 0,5% de SFB e 0,3% de Triton X100 em PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo anti-Myc (N-262, Santa Cruz) na diluição de 1:10 em solução de 0,1% de BSA e 0,3% Triton X100 em PBS, a 4°C, durante 16h. Controles negativos foram incubados com soro irrelevante. Finalmente, após três lavagens com a solução de 0,1% de BSA e 0,3% Triton X100 em PBS, as lamínulas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako), por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas por 3 vezes com o mesmo tampão e montadas sobre lâminas de vidro com Fluoromount (Southern Biotech).

Após a captura de imagens feita com a câmera Olympus DP70 acoplada ao microscópio de fluorescência Olympus IX70, a fluorescência emitida foi medida pelo programa Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics).

Foram realizados oito experimentos e, em cada um deles, analisados no mínimo quatro campos e, pelo menos, 300 células.

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas com o auxílio do “software” SPSS 10.0 for Windows (SPSS Incorporation); foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, para as comparações entre os clones. Também foi aplicado o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos de clones *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}*.

3.7 ENSAIO DE TUMORIGÊNESE

Foram injetadas 5×10^5 células em 100 μ l de PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,052M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,37M, NaCl 0,12mM), por via subcutânea, no dorso de camundongos normais (*Prnp^{+/+}*) do sexo masculino, de 8 a 10 semanas de idade. Após 21 dias, os camundongos foram sacrificados e o tumor primário foi retirado, pesado e fixado em solução de formol tamponado a 3,5% para análise posterior. O fígado e os pulmões dos animais também foram submetidos a observação macroscópica para evidenciar possíveis metástases sem que, no entanto, qualquer alteração tenha sido encontrada.

3.8 CRESCIMENTO CELULAR

Foram realizadas curvas de crescimento celular plaqueando-se 3×10^5 células dos clones *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}* selecionados sobre placas de petri de 100mm de diâmetro (Corning) em meio de cultura (DMEM) suplementado com 10% de SFB. As células foram removidas das placas de cultura pelo

uso de tripsina, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento e contadas em câmara de Neubauer.

3.9 DOSE TUMORAL MÍNIMA

Células dos clones B3, C5, E10 (*Prnp^{0/0}*), T16, U14 e V12 (*Prnp^{+/+}*) selecionados foram injetadas em número de 10^3 , 10^4 ou 10^5 células por animal. As células foram injetadas em 100µl de PBS por via subcutânea, na região dorsal de camundongos *Prnp^{+/+}*, entre 8 a 10 semanas de idade, do sexo masculino, obtidos a partir do cruzamento de descendentes da primeira geração resultante do acasalamento entre 129/SV e C57BL/6J. Para cada dose de cada clone foram utilizados 9 ou 10 animais. O desenvolvimento dos tumores foi observado semanalmente por palpação e os resultados dispostos em curvas de sobrevida livre de doença.

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas com o auxílio do “software” SPSS 10.0 for Windows (SPSS Incorporation); foram realizadas curvas de probabilidade/taxa de sobrevida livre de doença pelo método de Kaplan-Meier.

3.10 COLONIZAÇÃO PULMONAR

As células dos clones *Prnp^{+/+} ras/myc* e *Prnp^{0/0} ras/myc* foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e removidas da placa de

cultura por adição de solução de tripsina a 0,2% (Instituto Adolfo Lutz), submetidas a centrifugação (durante 4 minutos, a 1500xg) para a remoção do excesso de tripsina e incubadas durante 1 hora, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, para que a membrana plasmática se recuperasse da ação proteolítica da tripsina. Em seguida, as células foram centrifugadas (4 minutos, 1500xg), lavadas com solução de PBS (Na₂HPO₄.7H₂O 0,052M, NaH₂PO₄.H₂O 0,37M, NaCl 0,12mM), novamente centrifugadas (4 minutos, 1500xg) e, finalmente, suspensas em PBS de modo que a suspensão resultante contivesse 10⁶ células em 100µl.

Foram utilizados camundongos selvagens (*Prnp*^{+/+}), do sexo masculino, entre 8 a 10 semanas de idade, obtidos a partir do cruzamento de descendentes da primeira geração resultante do acasalamento entre 129/SV e C57BL/6J. Cada animal recebeu injeção contendo 10⁶ células de um dos clones *Prnp*^{+/+} ou *Prnp*^{0/0} selecionados, através da veia lateral caudal. Os animais foram sacrificados 21 dias após a injeção para a contagem de colônias pulmonares (HIRATA e TANAKA 1984; O'REILLY et al. 1994; CLARK et al. 2000).

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas com o auxílio do "software" SPSS 10.0 for Windows (SPSS Incorporation); foram realizados o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, para as comparações entre os clones. Também foi aplicado o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos de clones *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0}.

3.11 DEPOSIÇÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

CEM *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0} foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, em DMEM suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as lamínulas foram lavadas uma vez com meio de cultura DMEM, fixadas com solução fixadora (paraformaldeído a 4%, 0,12M sacarose em PBS) por 2 minutos a temperatura ambiente, lavadas por três vezes com PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,052M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,37M, NaCl 0,12mM) durante 5 minutos e incubadas durante 12 horas com os anticorpos primários diluídos em PBS acrescido de 1% de BSA:

- IgG purificada produzida em coelho contra laminina (LN) (3,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$),
- IgG purificada a partir de coelho não imunizado (3,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$),
- soro produzido em coelho contra fibronectina (FN), título 1:50,
- soro irrelevante produzido em coelho, título 1:50.

Após a incubação do anticorpo primário as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário contra IgG de coelho marcado com FITC (Dako), na diluição de 1:250 em PBS acrescido de 1% de BSA, durante 1 hora e, a seguir, as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com Fluoromount (Southern Biotech) e observadas em microscópio de fluorescência IX70, Olympus.

3.12 ANÁLISE DA SECREÇÃO DE METALOPROTEINASES

Neste ensaio, foi feita a determinação quantitativa de metaloproteases empregando-se meios condicionados obtidos na cultura dos clones selecionados *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}* transformados com os oncogenes *ras* e *myc*.

As células foram cultivadas normalmente e, ao atingirem aproximadamente 70% de confluência, tiveram o meio de cultura habitual removido, foram lavadas por três vezes com DMEM e permaneceram em cultivo por 24 horas com DMEM sem SFB.

Após a coleta dos meios que foram condicionados durante 24 horas, precipitou-se as proteínas aí presentes empregando-se quantidade suficiente de sulfato de amônio para atingir 80% de saturação da solução e, em seguida, as proteínas precipitadas foram solubilizadas e dialisadas em água. As soluções protéicas foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 10% contendo 1,5mg/ml de gelatina (Bio-rad), em ambiente não redutor. A seguir, os géis foram lavados por 30 minutos em solução aquosa de triton X100 (Sigma) a 2% e incubados por 12 horas, a 37°C, sob agitação, em solução tampão Tris 50mM pH 8,0 contendo 0,5mM CaCl₂ e 1mM ZnCl₂ (WEEKS et al. 1998; SILVA et al. 2001). Após a incubação, os géis foram corados com solução de 0,25g de Coomassie Blue (Inlab), 50% de metanol e 10% de ácido acético glacial e descorados com solução descorante (solução contendo 30% metanol e 10% ácido acético glacial). O Coomassie Blue cora a matriz do gel que contém gelatina mas não cora a região correspondente às bandas de metaloproteases, já que estas digeriram a gelatina aí localizada.

3.13 MIGRAÇÃO DE CÉLULAS A PARTIR DE ESFERÓIDES MULTICELULARES FRENTE A PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Para gerar os esferóides de células, placas de 24 poços foram recobertas com 0,25ml de suspensão de agarose (Gibco) a 1% em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco), para formar uma fina camada de gel sobre a qual foram semeadas 10^5 células em 1ml de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). A placa foi incubada a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e agitada suavemente, num movimento rotatório, uma vez ao dia, durante os 3 primeiros dias, após os quais se tornou evidente um único agregado de células ou esferóide multicelular.

Os esferóides multicelulares foram então semeados com 1ml de DMEM sem SFB, em placas de 24 poços, os quais foram previamente tratados com as proteínas de matriz extracelular LN, FN, VN ou ainda sem tratamento prévio. O tratamento consistiu em adicionar a cada poço 300µl de solução de uma dessas proteínas em PBS, na concentração de 10µg/ml e, em seguida, permitir que as soluções secassem, deixando a placa aberta em ambiente estéril por aproximadamente 12 horas. Antes do plaqueamento, os poços foram lavados com 1ml de DMEM. Após 24 horas, observou-se a migração celular a partir dos esferóides (TYSNES et al. 1996). A área do halo de migração celular foi calculada levando-se em conta dois diâmetros ortogonais.

3.14 EXPRESSÃO DE ICAM-1, SUBUNIDADE α_v DE INTEGRINA E CADERINAS

CEMs *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0} e células dos clones selecionados *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} foram cultivadas em garrafas de cultura (Costar) de 162 cm² e empregadas quando atingiram aproximadamente 70% de confluência. O meio de cultura das células foi removido e estas foram lavadas com solução de PBS/EDTA (Na₂HPO₄.7H₂O 0,052M, NaH₂PO₄.H₂O 0,37M, NaCl 0,12mM e EDTA 0,5mM - pH 7,4) e removidas da placa de cultura por adição de solução de tripsina a 0,2% (Instituto Adolfo Lutz), submetidas a centrifugação (durante 2 minutos, a 1500xg) para a remoção do excesso de tripsina e incubadas durante 1 hora, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, para que a membrana plasmática se recuperasse da ação proteolítica da tripsina. A seguir, as células foram lavadas em PBS, novamente centrifugadas (2 minutos, a 1500xg) e alíquotas contendo 10⁶ células foram incubadas com os anticorpos primários ou com os anticorpos irrelevantes correspondentes (vide tabela 4) na mesma concentração, num volume total de 100µl, durante uma hora a 4°C. A seguir, as células foram lavadas por três vezes com solução de PBS e centrifugadas a 1500xg por 1 minuto após cada lavagem e incubadas com os respectivos anticorpos secundários (tabela 4). Finalmente, as células foram ressuspensas em 500µl de solução de PBS e a leitura da intensidade de fluorescência foi realizada no equipamento FACScan (Beckton & Dickinson). A análise foi feita através do programa Lysis II.

Tabela 4 - Anticorpos primários e secundários empregados em citometria de fluxo para a determinação da expressão de ICAM-1, caderinas e da subunidade α_v de integrinas.

Anticorpo primário/ título	Antígeno	Anticorpo irrelevante/título	Anticorpo secundário/título
Anti-ICAM-1 acoplado a FITC – 1/100	ICAM-1 (CD54)	Soro de camundongo 1/100	Anti-camundongo-FITC 1/100 (Sigma)
Anti-pan caderina (Sigma) - 1/100	E-, N-, P-, V-, R- e T-caderinas	Soro de coelho/ 1/100	Anti-coelho-FITC 1/100 (Sigma)
Anti-CD51 (Pharmingen) - 1/100	Integrina subunidade α_v	Anti-rato - 1/100	Anti-rato-FITC 1/100 (Sigma)

3.15 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE $\alpha_v\beta_3$

CEMs e células de clones *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* foram cultivadas sobre lamínulas de vidro e fixadas com solução de paraformaldeído (Sigma) a 4% (sacarose 0,12% em PBS). Em seguida, as lamínulas foram submetidas a bloqueio com tampão TBS mais 0,1% de triton X100 (Sigma) e 1% de soro de cabra, durante uma hora. Após o bloqueio, as lamínulas receberam solução TBS contendo 0,1% de triton e 1% de soro de cabra e anticorpo anti-wow-1 1:4 (gentilmente cedido pelo Prof. Sanford Shattil, The Scripps Research Institute) e foram incubadas por 16h a temperatura ambiente. Após três lavagens com a solução de bloqueio, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo secundário, IgG contra IgG de camundongo Alexa 568 (Molecular Probes) durante uma hora. A seguir as lamínulas foram lavadas (3 vezes com solução de bloqueio) e montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem Fluoromount (Southern Biotech). Após a secagem, as lâminas foram observadas e as imagens resultantes foram

capturadas pela câmera Olympus DP70 acoplada ao microscópio de fluorescência Olympus IX70, e analisadas pelo software Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics). Foram analisados no mínimo quatro campos e, pelo menos, 300 células, em cada lâmina.

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas com o auxílio do “software” SPSS 10.0 for Windows (SPSS Incorporation); foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, para as comparações entre os clones. Também foi aplicado o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos de clones *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0}.

3.16 OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS PURIFICADAS DA MEC

3.16.1 PURIFICAÇÃO DE LAMININA

A laminina utilizada neste trabalho é de origem murina e foi purificada a partir de tumores Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) produzidos intramuscularmente em camundongos C57-BL10. O protocolo utilizado foi o descrito por (PAULSSON et al. 1987) e todos os passos realizados a 4°C.

Cerca de 60g de tumor congelado foi lentamente descongelado, dissociado mecanicamente com uma lâmina e homogeneizado por 60 segundos com 1200 ml de tampão TBS-PI para extração (0,15M de NaCl, 50 mM de Tris, 2 mM de NEM e 0,5mM de PMSF) e a ajuda de um liquidificador doméstico. O material foi então dividido em seis recipientes adequados para o rotor GS3 (Sorvall Co.) e centrifugado por 20 minutos a 8000rpm. O

sobrenadante de cada frasco foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 200ml de tampão TBS-PI para nova extração.

Novo ciclo de centrifugação foi feito e os sedimentos cuidadosamente combinados e transferidos para dois recipientes de centrífuga. Em cada frasco foi adicionado 150 ml de tampão TBS/EDTA-PI (tampão TBS-PI, 10 mM EDTA) e as proteínas do precipitado extraídas por 60 minutos com a ajuda de um agitador magnético. Após centrifugação, o sobrenadante, denominado EDTA1, foi recuperado e o sedimento, submetido a nova extração. O sobrenadante resultante (EDTA2) foi recuperado e o sedimento foi congelado em nitrogênio líquido para purificação de outras proteínas da matriz extracelular.

Os sobrenadantes EDTA1 e 2 foram combinados, divididos em alíquotas de aproximadamente 100ml, que foram armazenadas a -80°C quando não imediatamente utilizadas.

Uma alíquota de 100ml foi centrifugada por 20 minutos a 15000 rpm (rotor SS34 Sorvall Co.) e o sobrenadante aplicado em coluna Sepharose CL6B (Pharmacia, \varnothing 5x64cm, ca.1250ml) previamente equilibrada em tampão TBS-PI para Sepharose CL6B (tampão TBS-PI, 2,5 mM EDTA). Um fluxo de 50-60ml/h foi aplicado e alíquotas de 10ml foram coletadas. As frações foram monitoradas quanto a presença de proteínas em espectrofotômetro, utilizando-se valores de absorvância de 280nm.

As frações contendo laminina, correspondentes ao primeiro pico de absorvância, foram combinadas e diluídas com 50% do volume original com tampão Tris-HCl-PI (50 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 2 mM NEM e 0,5mM PMSF)

e aplicadas em coluna DEAE-Sephacel (Pharmacia, \varnothing 5x10cm, ca. 200ml) previamente equilibrada em tampão Tris-HCl-PI. Esta aplicação foi feita em sistema fechado, sob baixa taxa de vazão, durante 16 horas. A coluna foi em seguida lavada com 200ml de tampão Tris-HCl-PI e a laminina eluída com gradiente 0-0,8M de NaCl com um fluxo de 4ml/min. O monitoramento das frações foi feito em espectrofotômetro (280nm), e as frações correspondentes a laminina, combinadas e dialisadas por 16 horas contra TBS (0,15M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4). A laminina resultante teve a concentração protéica medida (valores típicos entre 0,1-0,8mg/ml) pelo método de BRADFORD (1976) sendo aliqüotada e armazenada a -80°C.

3.15.2 FIBRONECTINA E VITRONECTINA

A fibronectina e a vitronectina, obtidas a partir de plasma humano, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Silvio Sanches Veiga (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná) e foram purificadas, respectivamente, segundo os protocolos já estabelecidos (ENGVALL e RUOSLAHTI 1977; YATOHGO et al. 1988).

4 RESULTADOS

Para que pudéssemos avaliar a participação da proteína prion celular (PrPc) em tumorigênese experimental, transformamos células embrionárias mesenquimais (CEM) imortalizadas, oriundas de embriões de camundongos tipo selvagem (CEM *Prnp*^{+/+}) e deficientes de PrPc (CEM *Prnp*^{0/0}), com a construção contendo os oncogenes *ras* e *myc* virais, representada na Figura 1 (THOMPSON et al. 1989; COMPERE et al. 1989). O vetor empregado também contém um gene cujo produto confere resistência ao antibiótico neomicina (Geneticin – Invitrogen). Após 7 dias de tratamento com este antibiótico, isolaram-se apenas os clones que foram transfectados e expressaram os oncogenes.

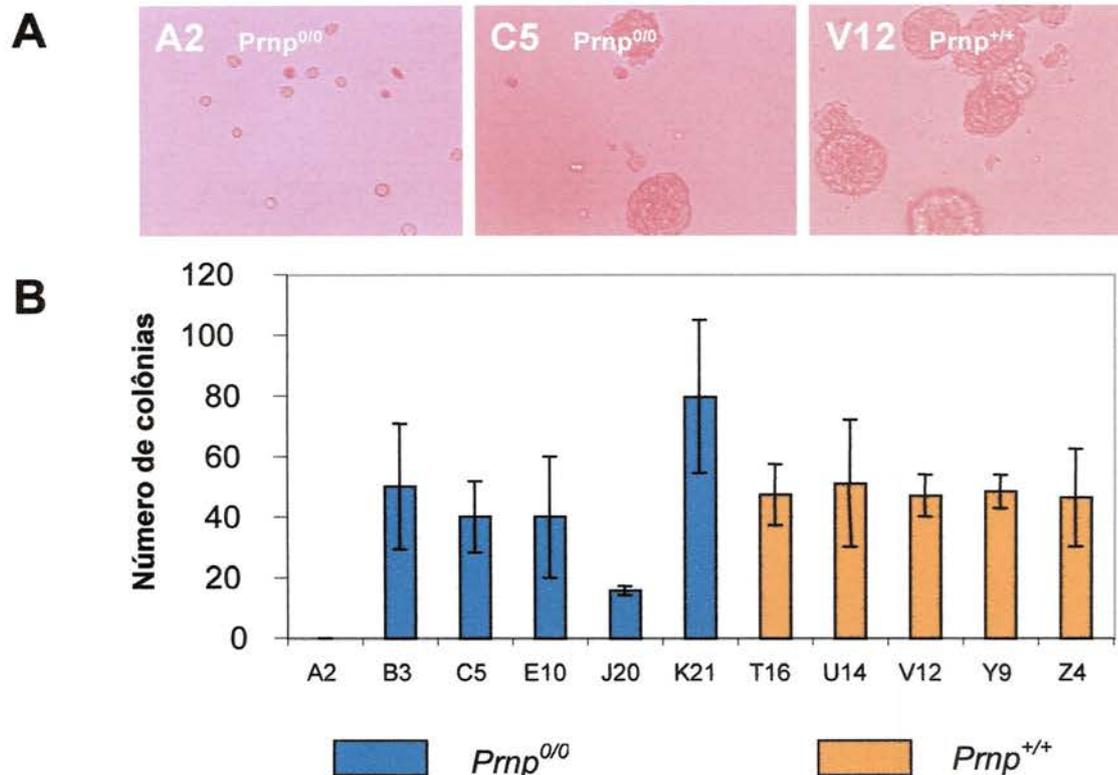
Os clones foram então caracterizados com o objetivo de empregá-los como ferramenta de trabalho no nosso estudo.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES OBTIDOS

4.1.1 Ensaio de Crescimento em Suspensão – Ágar Mole

Para caracterizar os clones isolados e avaliar sua transformação, estes foram submetidos a cultivo em ágar mole, condição em que não há ancoragem das células sobre as proteínas de matriz extracelular (MEC) que, entre outras, é uma característica de células tumorais.

Os clones *Prnp^{0/0}* (B3, C5, E10, J20 e K21) e todos os clones *Prnp^{+/+}* (T16, U14, V12, Y9 e Z4) foram capazes de crescer em suspensão. Apenas o clone A2 (*Prnp^{0/0}*) não exibiu esta característica (Figura 2).



Legenda: As células foram cultivadas em ágar mole e foi determinado o número de colônias formadas após 21 dias.

A: fotomicrografia (aumento de 100x) representativa do crescimento celular em suspensão: o clone A2 (*Prnp^{0/0}*), não é capaz de crescer independente de ancoragem enquanto que os clones C5 (*Prnp^{0/0}*) e V12 (*Prnp^{+/+}*) o fazem.

B: Quantificação do número de colônias formadas 21 dias após a semeadura de 100 células. Os valores representam a média e o desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

Figura 2 - Determinação da eficiência de crescimento em suspensão de clones celulares derivados de células mesenquimais embrionárias de camundongos selvagens (*Prnp^{+/+}*) e deficientes para PrPc (*Prnp^{0/0}*), transfectados com os oncogenes *myc* e *ras*.

Conforme os dados representados na Figura 2, selecionamos três clones de cada grupo, entre os que se mostraram capazes de crescer em suspensão (Tabela 5). Estes clones foram utilizados nos experimentos subsequentes.

Tabela 5 - Clones selecionados: para o seguimento do estudo, clones foram selecionados por exibirem capacidade semelhante de crescimento independente de ancoragem.

	Clones selecionados
<i>Prnp</i> ^{0/0}	B3, C5, E10
<i>Prnp</i> ^{+/+}	T16, U14, V12

4.1.2 Avaliação Semi-Quantitativa do Acúmulo das Proteínas Ras e Myc nos Clones *Prnp*^{+/+} E *Prnp*^{0/0}

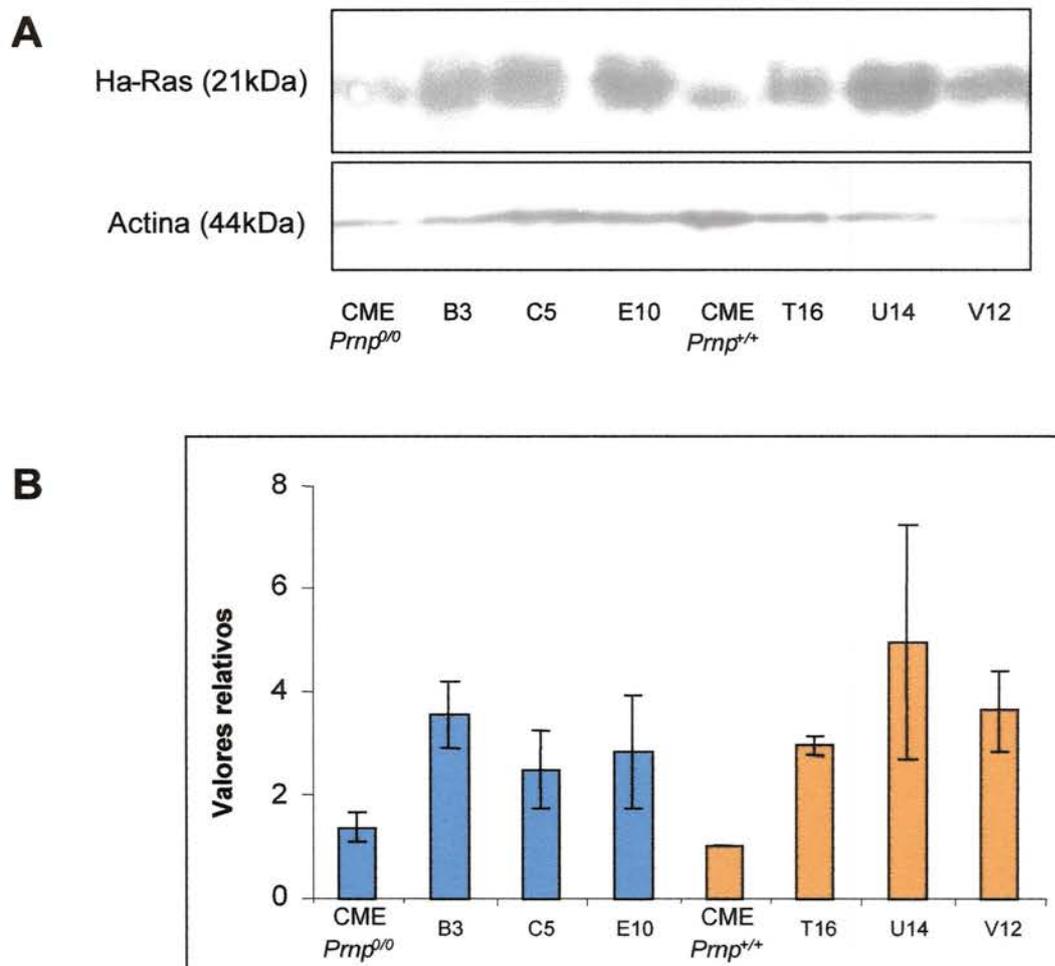
Extratos protéicos preparados a partir de culturas dos clones selecionados *Prnp*^{0/0} (B3, C5 e E10) e *Prnp*^{+/+} (T16, U14 e V12) foram submetidos a separação eletroforética e subsequente detecção da proteína Ras, por “immunoblotting”. As bandas obtidas a partir dos autorradiogramas das reações de “immunoblotting” foram submetidas a densitometria para avaliação semi-quantitativa da expressão da proteína Ras. O valor arbitrário de 1 foi atribuído à expressão de Ras na célula parental tipo selvagem (CEM *Prnp*^{+/+}) e calculou-se em relação a esta, a quantidade de Ras expressa nos clones gerados. A carga protéica foi normalizada a partir do uso do mesmo

número de células no preparo dos extratos, o que se mostrou eficaz considerando-se que a reação para actina, proteína constitutivamente expressa, manteve-se semelhante para todas as células testadas (Figura 3).

Os dados mostram que a expressão desta oncoproteína é equivalente entre todos os clones obtidos (Figura 3).

A expressão de Myc foi avaliada por imunofluorescência, uma vez que não foram obtidos resultados satisfatórios a partir de ensaios de “immunoblotting”. Pode-se observar que a positividade para a oncoproteína Myc nos clones é maior que nas células parentais e equivalente entre eles (Figura 4). É possível observar ainda que a fluorescência concentra-se no núcleo da célula, como esperado, uma vez que Myc localiza-se principalmente nessa região subcelular.

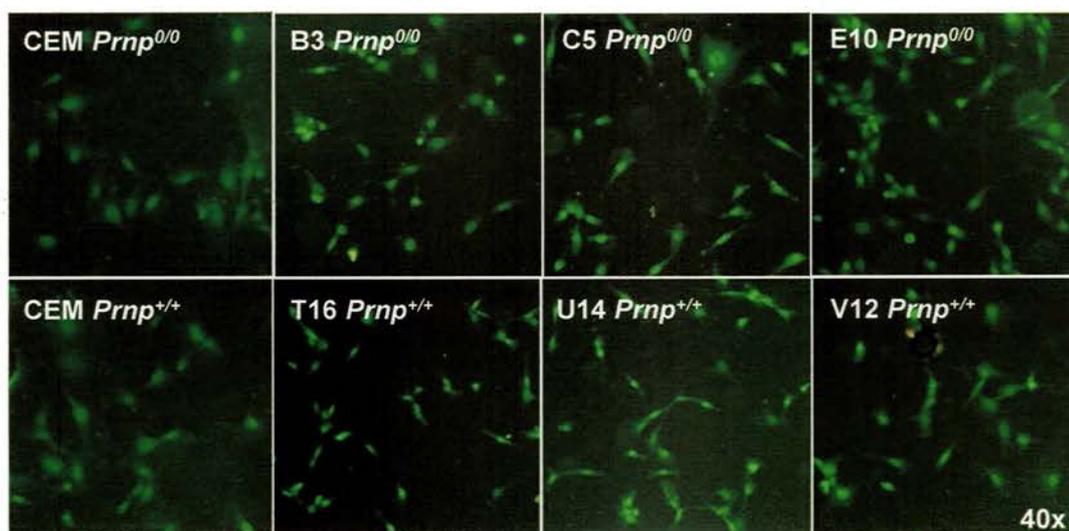
Portanto, os clones foram usados em experimentos posteriores, de forma que eventuais diferenças entre eles pudessem ser atribuídas à presença ou ausência da proteína PrPc, e não a variações existentes na expressão das oncoproteínas.



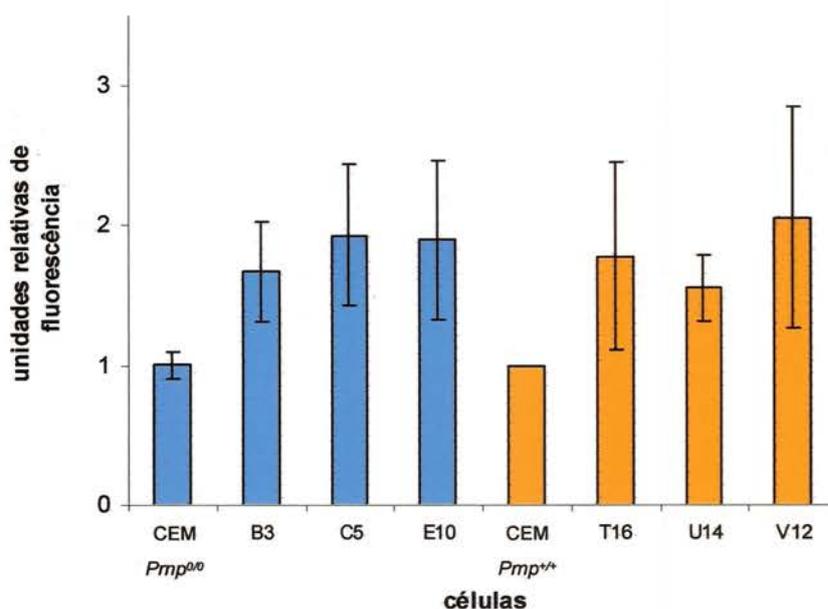
Legenda: A: Autorradiograma representativo de reações de "immunoblotting" para as proteínas Ras e actina

B: Expressão relativa de Ras nos clones gerados. Os valores representam a média e desvio-padrão de 3 experimentos.

Figura 3 - Expressão da oncoproteína Ras nos clones de células $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$.



B



Legenda: A: Fotomicrografias representativas da reação de imunofluorescência para a proteína Myc nas células parentais (CEM *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+}) e em cada um dos clones estudados (B3, C5, E10, T16, U14 e V12);

B: Expressão relativa da proteína Myc, em culturas dos clones selecionados, em comparação com a célula parental tipo selvagem (CEM *Prnp*^{+/+}). Os valores representam a média e desvio padrão de pelo menos 3 experimentos. Foram avaliados no mínimo 4 campos e pelo menos 300 células em cada lâmina.

Figura 4 - Expressão da oncoproteína Myc nos clones *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0}.

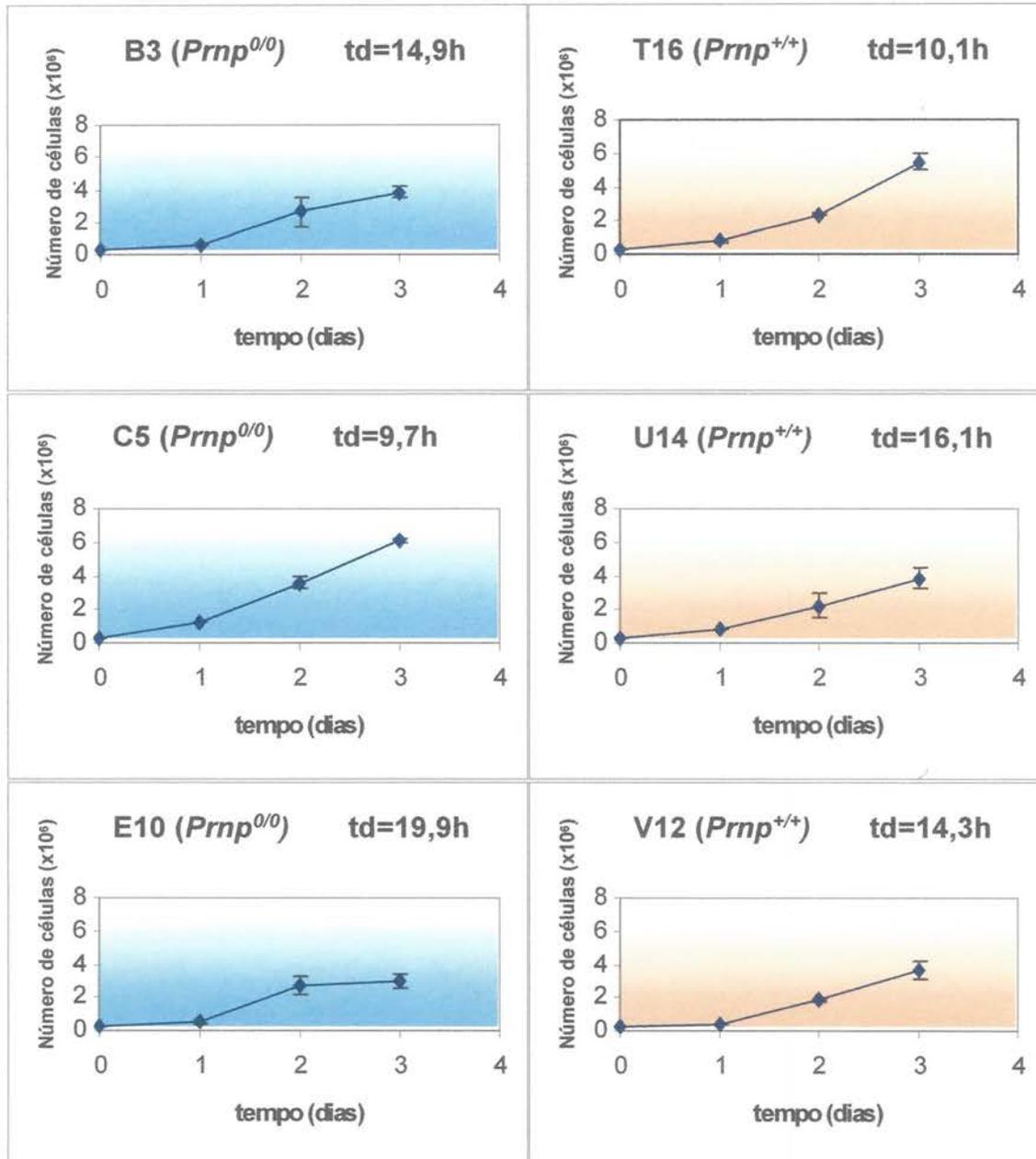
4.1.3 Crescimento Celular

Os clones celulares selecionados $Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$ apresentam comportamento muito semelhante em cultura, caracterizado por intensa divisão celular e ausência de inibição de crescimento mediada por contato. A avaliação do crescimento celular (figura 5) mostrou que os clones C5 ($Prnp^{0/0}$) e T16 ($Prnp^{+/+}$) parecem apresentar taxas de crescimento um pouco maiores que os outros clones. Os demais clones apresentaram velocidade de crescimento muito semelhante entre eles. Entretanto a avaliação estatística mostrou que não existe diferença significativa entre as taxas de crescimento dos clones obtidos a partir de células $Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$.

4.2 ENSAIO DE TUMORIGÊNESE

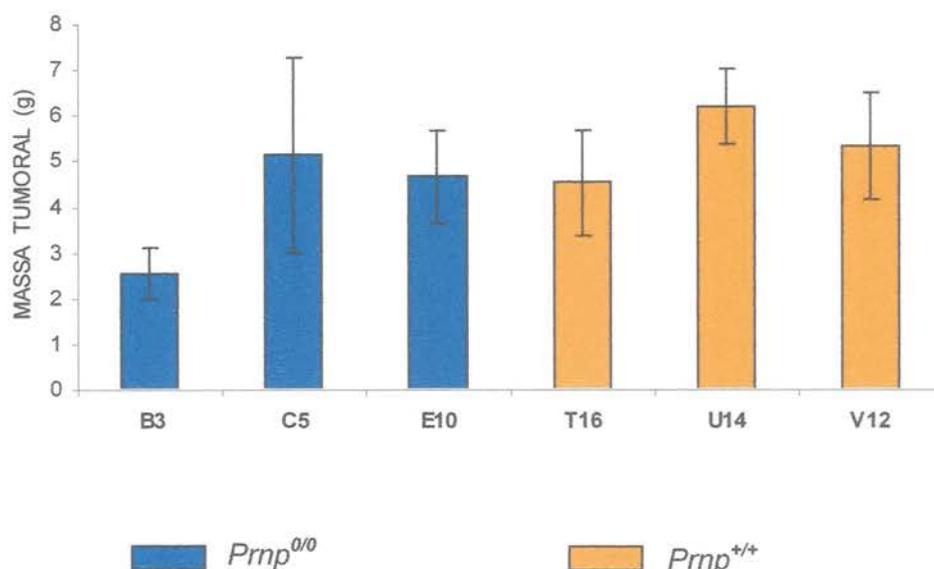
Na tentativa de verificar se havia correlação entre a presença ou não de PrPc e a capacidade de produzir tumores *in vivo*, realizamos ensaios de tumorigênese. Os resultados estão apresentados na figura 6 e mostram quantificação da massa tumoral presente no dorso dos animais após 21 dias da injeção subcutânea de 5×10^5 células.

Todos os clones foram capazes de gerar tumores *in vivo* entretanto, não se observaram diferenças quanto ao seu crescimento, a partir dos dois grupos de clones (Figura 6), sugerindo que a expressão de PrPc não influencia a implantabilidade e o crescimento *in vivo* dessas células.



Legenda: A quantidade de 3×10^5 células dos clones *Prnp*^{0/0} (B3, C5, E10) e *Prnp*^{+/+} (T16, U14, V12), foram semeadas no dia 0 e contadas nos dias 1, 2 e 3. As curvas representam a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Figura 5 - Curvas de crescimento celular dos clones *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} e respectivos tempos de duplicação (td).



Legenda: Células de cada clone (5×10^5) foram injetadas no dorso de camundongos tipo selvagem e a massa tumoral presente foi quantificada 21 dias após injeção. Os valores representam a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Figura 6 - Tumorigênese experimental produzida pelos clones de células $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$.

4.3 DOSE TUMORAL MÍNIMA

Para determinar se existiriam alterações no crescimento, manutenção e sobrevivência das células tumorais *in vivo* relacionadas à quantidade de células implantadas, foram realizados experimentos de dose tumoral mínima.

Neste experimento, monitorou-se o aparecimento de tumor à palpação semanalmente, após a injeção subcutânea dos clones de células $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$. Foram testados 10 animais para cada dose (10^4 , 10^5 e 10^6 células) dos clones T16 ($Prnp^{+/+}$), U14 ($Prnp^{+/+}$), C5 ($Prnp^{0/0}$) e E10 ($Prnp^{0/0}$), e 9 animais para cada dose dos clones B3 ($Prnp^{0/0}$) e V12 ($Prnp^{+/+}$).

A análise estatística de cada clone separadamente pode ter sido comprometida, uma vez que há variabilidade de resposta entre os animais e, desta forma, o número de animais testados pode não ter sido suficiente para que se evidenciassem possíveis diferenças estatísticas. Assim, os dados foram reunidos em dois grupos de clones ($Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$), o que também se justifica para minimizar eventuais efeitos clonais. Os dados de probabilidade de sobrevivência livre de tumor a partir de cada dose injetada, para cada grupo, foram dispostos nas Tabelas 6 e 7 e na Figura 7.

A formação de tumor parece ser dose-dependente nos dois grupos celulares. No entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, $Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$ (Figura 7).

Comparamos ainda clones $Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$ para cada dose de células injetadas. A Figura 8 mostra que o desenvolvimento de tumor para cada uma das doses é semelhante tanto para células $Prnp^{+/+}$ quanto para aquelas $Prnp^{0/0}$, não se observando diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$).

Estes dados são consistentes com os mostrados no experimento de tumorigênese experimental (Figura 6), onde não se detectou alterações no crescimento tumoral entre os clones escolhidos.

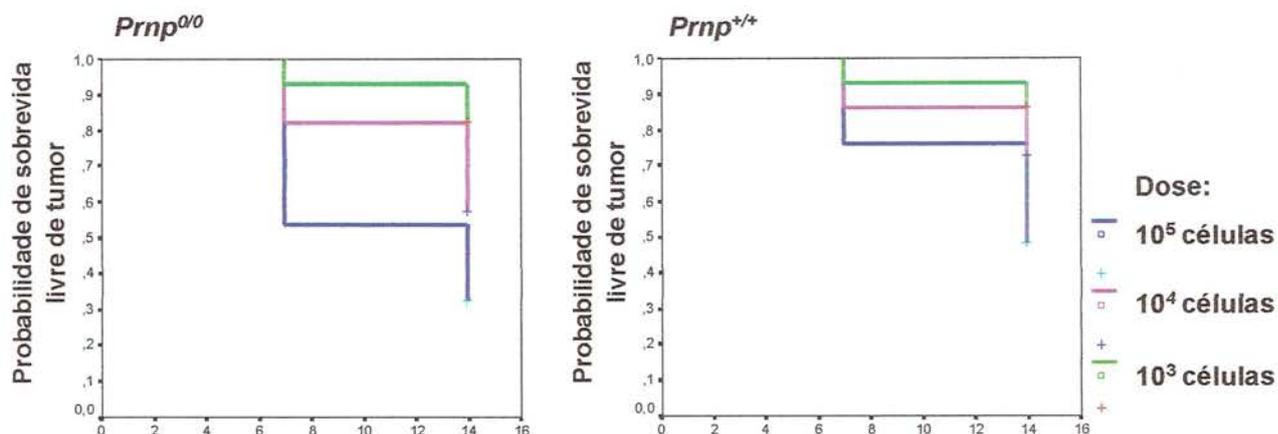
Tabela 6 - Taxa de sobrevida livre de doença após injeção subcutânea de células tumorais *Prnp*^{0/0}. Foi determinada a taxa de sobrevida livre de doença, em camundongos, 14 dias após injeção subcutânea de 10³, 10⁴ ou 10⁵ células dos clones *Prnp*^{0/0}.

Clones <i>Prnp</i>^{0/0}	
Número de células (dose)	Taxa de sobrevida livre de doença (14 dias)
1000	82,1%
10000	57,1%
100000	32,1%

Tabela 7 - Taxa de sobrevida livre de doença após injeção subcutânea de células tumorais *Prnp*^{+/+}.

Clones <i>Prnp</i>^{+/+}	
Número de células (dose)	Taxa de sobrevida livre de doença * (14 dias)
1000	86,2%
10000	72,4%
100000	48,3%

* Foi determinada a taxa de sobrevida livre de doença em camundongos, 14 dias após injeção subcutânea de 10³, 10⁴ ou 10⁵ células dos clones *Prnp*^{+/+}.

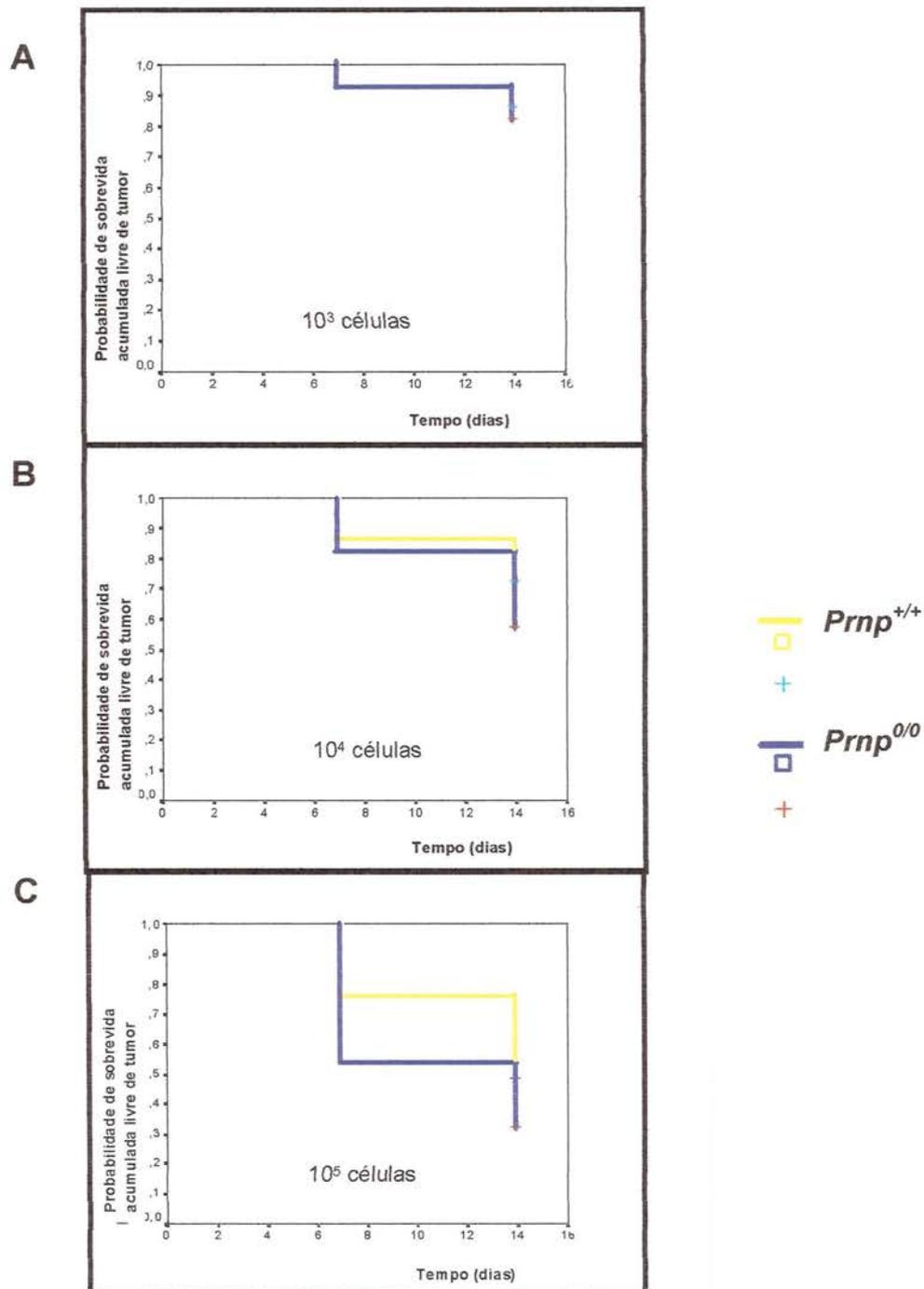


Legenda: Probabilidade de sobrevida livre de tumor, em camundongos tipo selvagem, 14 dias após injeção subcutânea de 10³ (verde), 10⁴ (rosa) ou 10⁵ (azul) células dos clones *Prnp*^{0/0} ou *Prnp*^{+/+}. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de clones em cada dose testada. Análise de sobrevida de Kaplan-Meyer.

Figura 7 - Probabilidade de sobrevida livre de tumor após injeção subcutânea de células tumorais *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+}, em camundongos tipo selvagem.

4.4 COLONIZAÇÃO PULMONAR

Para estudar a participação de PrPc em modelo de metástase experimental foram realizados experimentos de colonização pulmonar. Neste experimento, camundongos machos, tipo selvagem, receberam injeção intravenosa (veia lateral caudal) de 10⁶ células de cada um dos clones uygiffyselecionados. Após 21 dias, foi determinado o número de colônias presentes do pulmão de cada animal.



Legenda: Para cada dose empregada, 10^3 (A), 10^4 (B) e 10^5 (C), foi calculada a probabilidade acumulada de sobrevivida livre de tumor, 14 dias após injeção subcutânea de células dos clones $Prnp^{0/0}$ (azul) e $Prnp^{+/+}$ (laranja), em camundongos tipo selvagem. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos de clones $Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$. Análise de sobrevivida de Kaplan-Meyer.

Figura 8 - Probabilidade acumulada de sobrevivida livre de tumor após injeção subcutânea de células tumorais $Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$, em camundongos tipo selvagem.

A Tabela 8 mostra o número de colônias celulares tumorais encontradas no pulmão de animais que receberam cada um dos clones transformados de células *Prnp^{0/0}* ou *Prnp^{+/+}*.

Quando obteve-se contagem do número de colônias pulmonares maior que 100 (geralmente incontáveis, dada a presença de sobreposição entre colônias), considerou-se como equivalente a 100 colônias. Desta forma, corremos o risco de que os dados fossem subestimados, porém, isto permitiu a análise estatística dos dados. A tabela 8 exibe o número de colônias presente em cada animal avaliado. Os valores estão dispostos em ordem crescente de valor e não segundo a ordem cronológica em que o experimento foi realizado.

As análises estatísticas realizadas a partir da tabela 8 estão mostradas na Tabela 9 e na Figura 9 e revelam que o número de colônias pulmonares formadas pelos clones B3, C5 e E10 (*Prnp^{0/0}*) é estatisticamente maior que aquele produzido pelos clones T16, U14 e V12 (*Prnp^{+/+}*).

Cabe ressaltar que, entre os clones *Prnp^{0/0}* (B3, C5 e E10), não houve diferenças significativas, com valores de *p* entre 0,373 e 0,996. Também não foram significativas as diferenças entre os clones *Prnp^{+/+}* (V12, T16 e U4), com valores de *p* entre 0,987 e 1,000.

Tabela 8 - Número de colônias pulmonares obtidas em experimento de metástase experimental (colonização pulmonar).

Clones	Número de animais	Número de colônias pulmonares *
B3 (<i>Prnp^{0/0}</i>)	26	0, 0, 0, 3, 5, 25, 30, 30 32, 35, 60, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100.
C5 (<i>Prnp^{0/0}</i>)	16	5, 35, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100.
E10 (<i>Prnp^{0/0}</i>)	13	20, 20, 33, 45, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100, >100.
T16 (<i>Prnp^{+/+}</i>)	24	0, 0, 0, 0, 0, 1, 4, 4, 8, 8, 10, 10, 12, 15, 15, 15, 20, 20, >100, >100, >100, >100, >100, >100.
U14 (<i>Prnp^{+/+}</i>)	21	0, 0, 0, 0, 0, 3, 3, 4, 7, 15, 15, 15, 15, 17, 33, 45, >100, >100, >100, >100, >100.
V12 (<i>Prnp^{+/+}</i>)	8	0, 0, 0, 2, 6, 7, 15, >100.

* Número de colônias presentes na superfície pulmonar de camundongos tipo selvagem 21 dias após receberem injeção de 10^6 células, na veia caudal, de um dos clones celulares especificados.

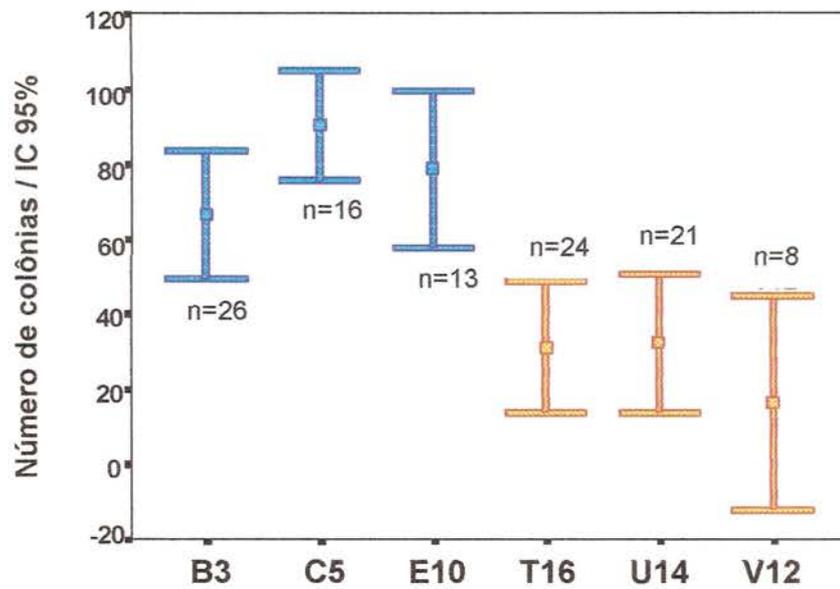
Tabela 9 - Colonização pulmonar.

Clone	Média do número de colônias pulmonares* (desvio-padrão)
B3 (<i>Prnp</i>^{0/0})	66,2 (42,2)
C5 (<i>Prnp</i>^{0/0})	90,0 (27,9)
E10 (<i>Prnp</i>^{0/0})	78,3 (34,4)
T16 (<i>Prnp</i>^{+/+})	30,9 (41,2)
U14 (<i>Prnp</i>^{+/+})	32,0 (40,6)
V12 (<i>Prnp</i>^{+/+})	16,3 (34,2)

* Média e desvio padrão do número de colônias produzidas no pulmão de camundongos que receberam um dos clones celulares especificados.

Na tentativa de diluir diferenças clonais entre as células do mesmo grupo, fizemos avaliações estatísticas a partir da associação dos clones dos dois grupos, *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} (figura 10). Nesta análise nota-se que as diferenças estatísticas são ainda mais robustas do que aquelas mostradas a partir da avaliação de cada clone isoladamente.

Estes dados indicam que a ausência de PrPc está associada a uma maior capacidade de colonização tumoral.



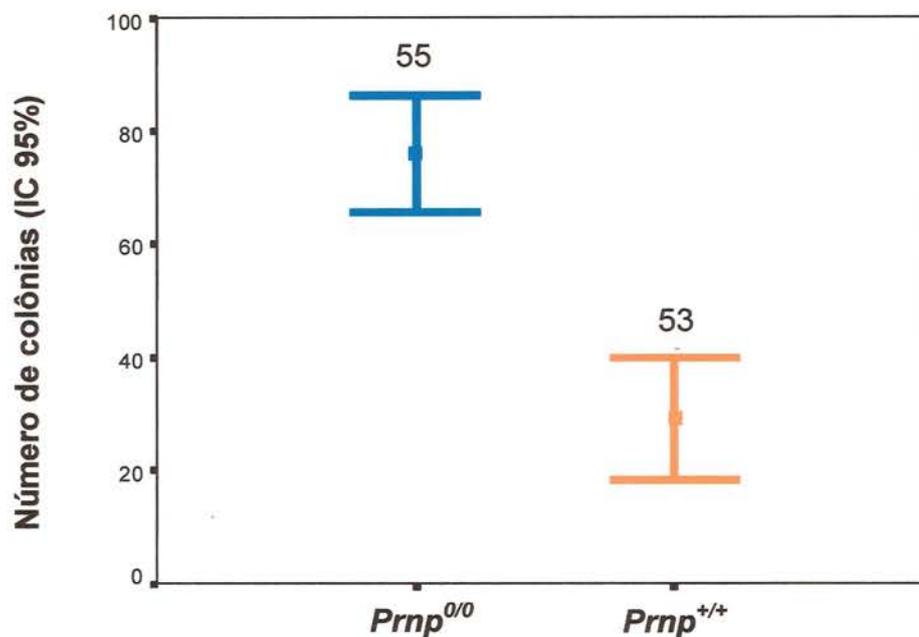
B3≠T16 (p=0,020), U14 (p=0,036), V12 (p=0,021)

C5≠ T16, U14, V12 (p<0,001)

E10≠ T16 (p=0,007), U14 (p=0,011), V12 (p=0,006)

Legenda: O número de animais testados com cada um dos clones *Pmp^{0/0}* (em azul - B3, C5 e E10) e *Pmp^{+/+}* (em laranja - T16, U14 e V12) está representado na abscissa. Na ordenada estão mostradas as médias do número de colônias obtidas para cada clone e os respectivos intervalos de confiança. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e análise de comparações múltiplas de Tukey.

Figura 9 - Médias do número de colônias obtidas em experimentos de colonização pulmonar e respectivos intervalos de confiança.



Legenda: Na abscissa, estão agrupados os 55 animais que receberam injeções de células *Prnp*^{0/0} (azul) e os 53 animais que receberam injeções de células *Prnp*^{+/+} (laranja). Na ordenada são mostradas as médias do número de colônias obtidas em cada grupo e os respectivos intervalos de confiança (teste de Mann-Whitney, **p*<0,001).

Figura 10 - Médias do número de colônias obtidas em experimentos de colonização pulmonar e respectivos intervalos de confiança.

4.5 PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

Experimentos de imunocitoquímica realizados pelo grupo mostraram diferenças no padrão de deposição da proteína de matriz extracelular laminina em cultura de células gliais (LIMA et al. em preparação). A laminina, ligante de PrPc, apresenta-se depositada predominantemente em forma pontual nas culturas de células gliais oriundas de animais *Prnp*^{0/0} e, nas

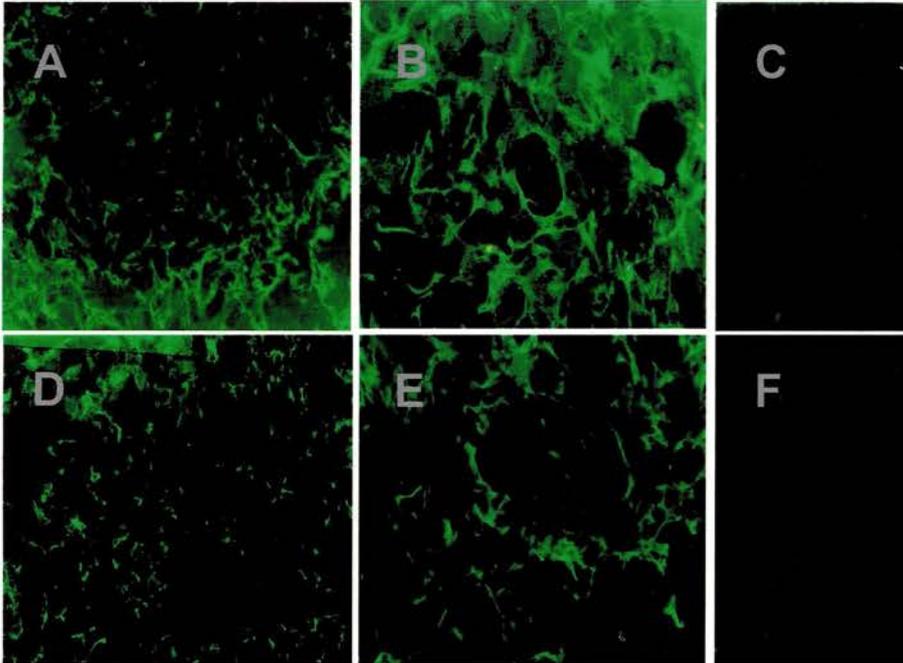
culturas de células gliais *Prnp*^{+/+} selvagens, a deposição apresenta um padrão fibrilar.

Portanto, na tentativa de explicar os resultados obtidos a partir da colonização pulmonar, nossa próxima abordagem foi avaliar se a deposição de laminina produzida pelos fibroblastos de animais *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} seguia o mesmo padrão daquele observado pelas células da glia.

Desta forma, foram realizados experimentos de imunocitoquímica em culturas dos fibroblastos parentais *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+}, para verificar a deposição da laminina produzida por estas células. Testamos ainda o padrão dos depósitos de fibronectina, outra proteína da MEC altamente expressa por fibroblastos. As células parentais foram escolhidas pois acreditamos que as diferenças não estão no processo de transformação celular mas existem em decorrência da ausência de PrPc já nas células parentais.

Conforme exibido na figura 11, não há diferenças no padrão de deposição de ambas as proteínas testadas, podendo-se notar que estas se apresentam num padrão fibrilar de deposição, tanto nas CEM *Prnp*^{0/0} quanto nas *Prnp*^{+/+}.

Portanto, a organização das proteínas da matriz extracelular produzidas pelos clones transformados de fibroblastos *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} não explica os dados obtidos no ensaio de colonização pulmonar.



Legenda: A, B e C: laminina, fibronectina e controle negativo, respectivamente, em CEM *Prnp^{0/0}*.

D, E e F: laminina, fibronectina e controle negativo, respectivamente, em culturas de CEM *Prnp^{+/+}*.

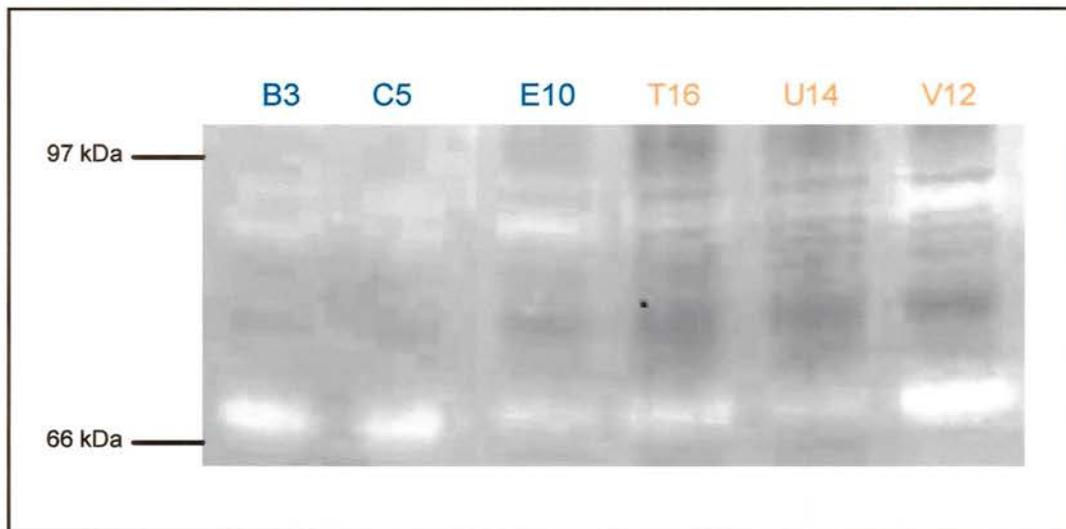
Figura 11 – Imunofluorescência para as proteínas de matriz extracelular laminina e fibronectina em culturas de CEM *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}* imortalizados.

4.6 SECREÇÃO DE METALOPROTEINASES

Noutra tentativa de compreender o(s) fator(es) que produziram os efeitos observados nos experimentos de colonização pulmonar *in vivo*, foram feitos zimogramas para a determinação da atividade das metaloproteinasas produzidas pelos clones selecionados *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}*. As metaloproteinasas são enzimas proteolíticas cuja atividade é dependente de íons zinco. Estas participam de processos fisiológicos e também podem estar envolvidas na disseminação de células tumorais, favorecendo as metástases, uma vez que clivam as proteínas de membrana basal e de matriz extracelular (YOON et al. 2003).

A abordagem experimental utilizada nestes experimentos permite avaliar a atividade de metaloproteinasas que agem especificamente sobre o colágeno denaturado (gelatinases), que é a proteína mais abundantemente expressa na matriz extracelular e membrana basal (WEEKS et al. 1998; SILVA et al. 2001). No entanto, nesses experimentos não se observou diferenças relativas ao tipo de metaloproteínase expressa ou quanto à atividade dessas enzimas, entre os clones *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* (Figura 12).

Portanto, os resultados apresentados no experimento colonização pulmonar entre os clones *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* não refletem diferenças quanto à secreção/ativação destas metaloproteinasas.



Legenda: Zimograma obtido a partir da eletroforese de meio condicionado obtido de clones *Prnp*^{0/0} (B3, C5 e E10) e *Prnp*^{+/+} (T16, U14 e V12) em gel de poliacrilamida polimerizado na presença de gelatina.

Figura 12 – Atividade de metaloproteinases (gelatinases A e B) nos clones *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+}.

4.7 COMPORTAMENTO DE ESFERÓIDES MULTICELULARES PRODUZIDOS A PARTIR DOS CLONES *Prnp*^{0/0} E *Prnp*^{+/+} FRENTE A PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

Os esferóides multicelulares são estruturas mantidas basicamente pela adesão intercelular, uma vez que são produzidos sobre camada de gel de agarose, que impede que as células adiram à placa de cultura, forçando a adesão célula-célula. Estes são formados graças à capacidade de crescimento independente de ancoragem exibida por células transformadas

(TYSNES et al. 1996; SCHWARTZ 1997). Ao serem cultivados sobre placas tratadas previamente com proteínas da matriz extracelular, as células mais superficiais dos esferóides tendem em maior ou menor grau a migrar, deixando o esferóide e aderindo às proteínas imobilizadas (TYSNES et al. 1996).

Os esferóides permitem, portanto, avaliar a relação entre as forças que mantêm as células unidas nessa estrutura tridimensional, como no êmbolo, e as exercidas por quimioatraentes, como proteínas da MEC solúveis no plasma ou imobilizadas em placas cultura. A relação entre essas forças poderia, portanto, ser refletida nos experimentos de metástase experimental, onde o evento de embolização é determinante da colonização pulmonar (NIESWANDT et al. 1999).

Neste experimento comparamos o comportamento de esferóides produzidos a partir de clones de células *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* frente a algumas proteínas de matriz extracelular, particularmente LN e VN, que foram caracterizadas pelo grupo como ligantes de PrPc, além de FN, que não se liga a PrPc (HAJJ et al. submetido).

Observando a figura 13, pode-se notar que os halos de migração produzidos pelos esferóides gerados a partir de clones *Prnp^{+/+}* são maiores do que aqueles de *Prnp^{0/0}*. Ao se quantificar e avaliar estes dados (figura 14) comprovamos que a maioria dos clones de *Prnp^{0/0}* apresentam uma migração estatisticamente diferente que aqueles de *Prnp^{+/+}*, independente do substrato (LN, VN, FN ou plástico).

Na Figura 15, os esferóides foram reunidos nos dois grupos, *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+}, e analisados em relação à migração nos três diferentes substratos presentes na placa de cultura (LN, VN, FN) e na ausência de qualquer tratamento (plástico). As análises estatísticas revelaram que os grupos *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} exibiram comportamentos significativamente diferentes ($p < 0,05$).

É interessante observar que o comportamento desses esferóides é muito semelhante seja em presença de VN ou de LN, ambos ligantes de PrPc (GRANER et al. 2000a e b; HAJJ et al. submetido) ou de FN, que não se associa a PrPc. Até mesmo quando cultivados sobre placas sem tratamento algum (plástico), os esferóides comportam-se seguindo o mesmo padrão. Desta forma, a maior migração dos clones *Prnp*^{+/+} em relação aos *Prnp*^{0/0} não deve ser dada pela ausência de PrPc nestas últimas, uma vez que o comportamento migratório independe do substrato ser ou não ligante específico de PrPc. Por outro lado, é possível que a menor migração dos clones *Prnp*^{0/0} seja ocasionada por uma maior adesividade célula-célula nestes esferóides.

Os resultados mostrados nos experimentos de esferóides poderiam explicar os dados obtidos a partir de colonização pulmonar. É possível que a maior capacidade de adesão célula-célula entre os clones *Prnp*^{0/0} leve-os a formar uma maior quantidade de êmbolos (comparativamente aos clones *Prnp*^{+/+}) na corrente sanguínea. Este evento poderia aumentar a sobrevivência celular no percurso até o pulmão. A maior formação de êmbolos também elevaria a retenção ("arrest") destas células quando de sua

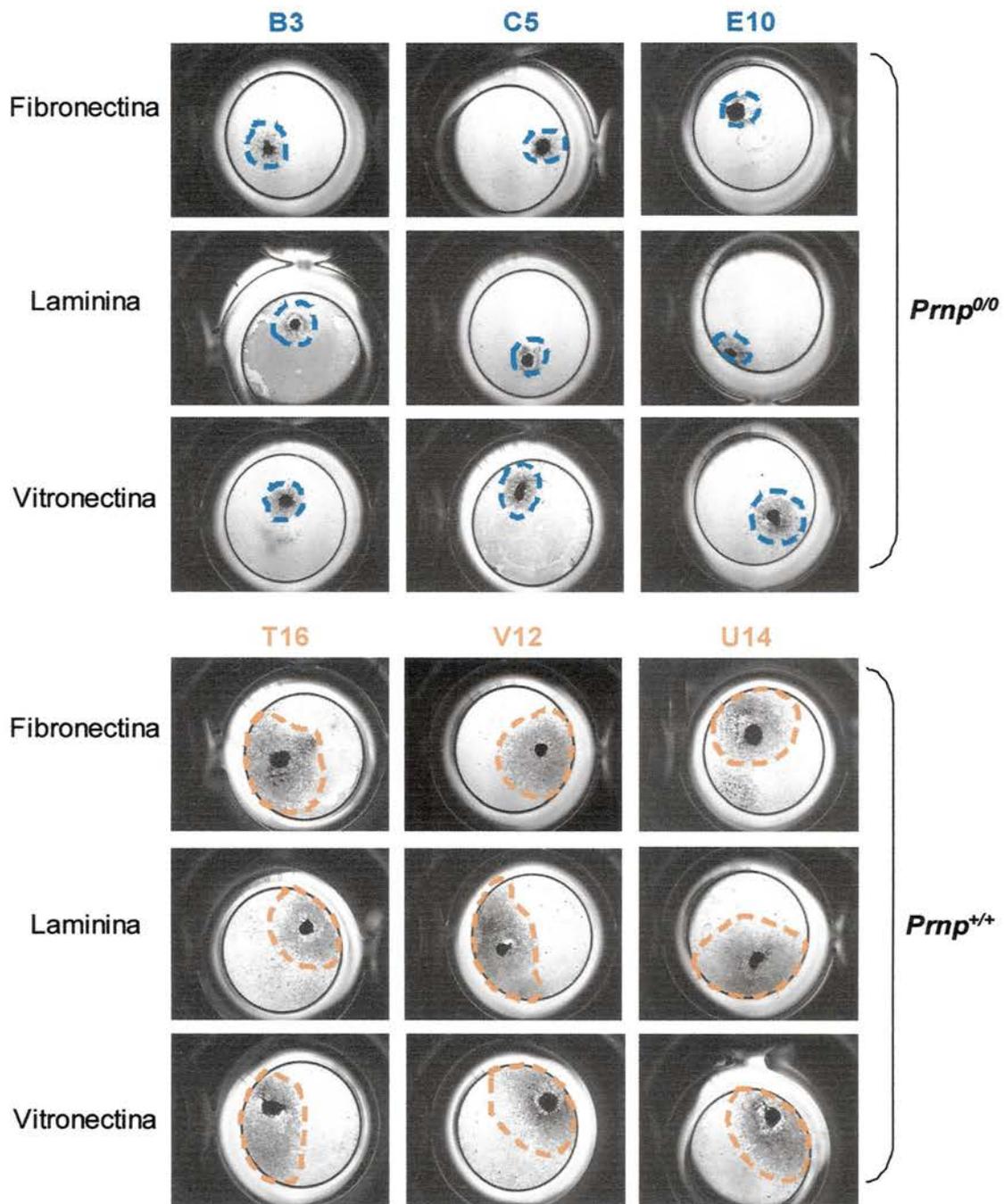
passagem pelos capilares sanguíneos do pulmão (ALONSO et al. 1999; FUSTER et al. 2003).

Esta hipótese nos levou a questionar se a expressão de PrPc poderia modular a expressão de caderinas, expressão/ativação de integrinas ou de outras moléculas envolvidas na adesão célula-célula.

4.8 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CÉLULA-CÉLULA

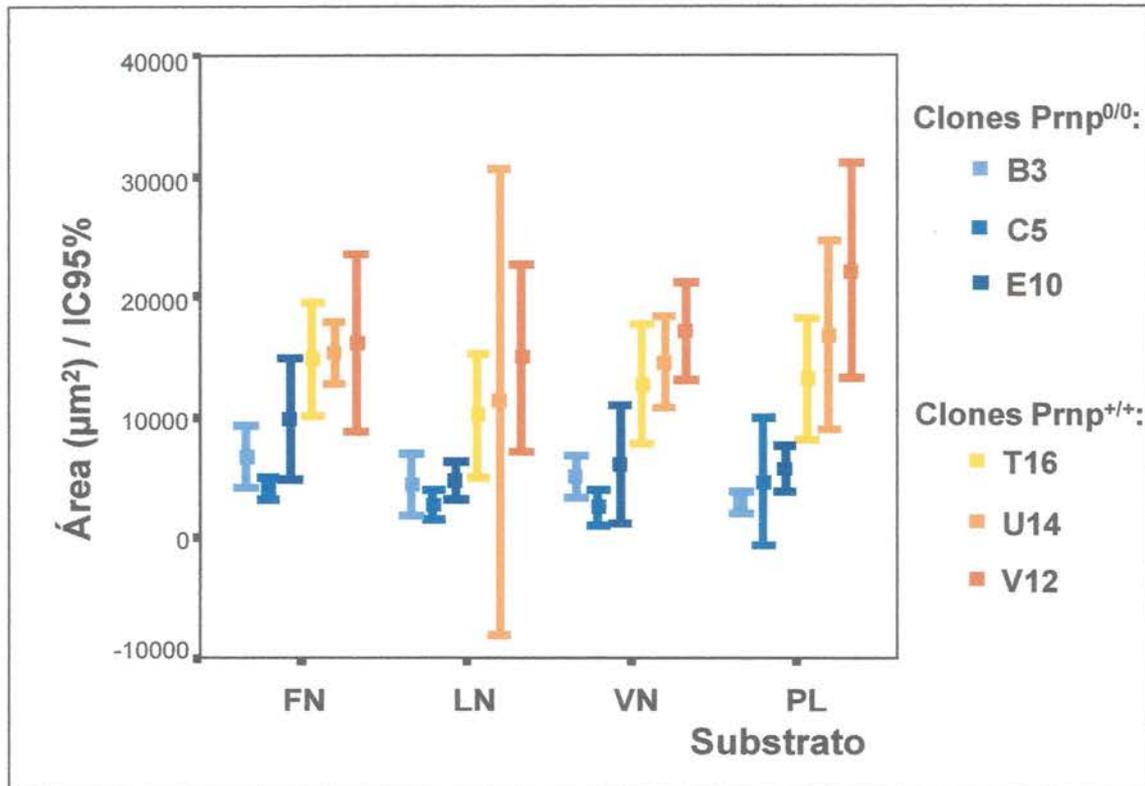
Os dados obtidos até então apontam para uma maior capacidade de adesão célula-célula entre os clones obtidos a partir de células *Prnp^{0/0}* que entre os *Pmp^{+/+}*. Moléculas de adesão intercelular estão envolvidas no processo de embolização das células tumorais, que se associam principalmente a plaquetas e ganham proteção contra a citólise (NIESWANDT et al. 1999; ALONSO et al. 1999; FUSTER et al. 2003). Assim, as moléculas de adesão intercelular podem favorecer a formação de colônias pulmonares nos experimentos de colonização pulmonar.

Desta forma, resolvemos avaliar a expressão de moléculas de adesão nas células parentais e/ou nos clones produzidos a partir dessas células.



Legenda: Observa-se a formação de halos de migração maiores entre os clones *Pmp^{+/+}* do que entre aqueles *Pmp^{0/0}*. Aumento de 40x.

Figura 13 – Fotomicrografia de experimento representativo mostrando esferóides multicelulares, produzidos a partir de clones *Pmp^{+/+}* e *Pmp^{0/0}*, cultivados sobre “coating” de proteínas da MEC (FN, LN e VN).

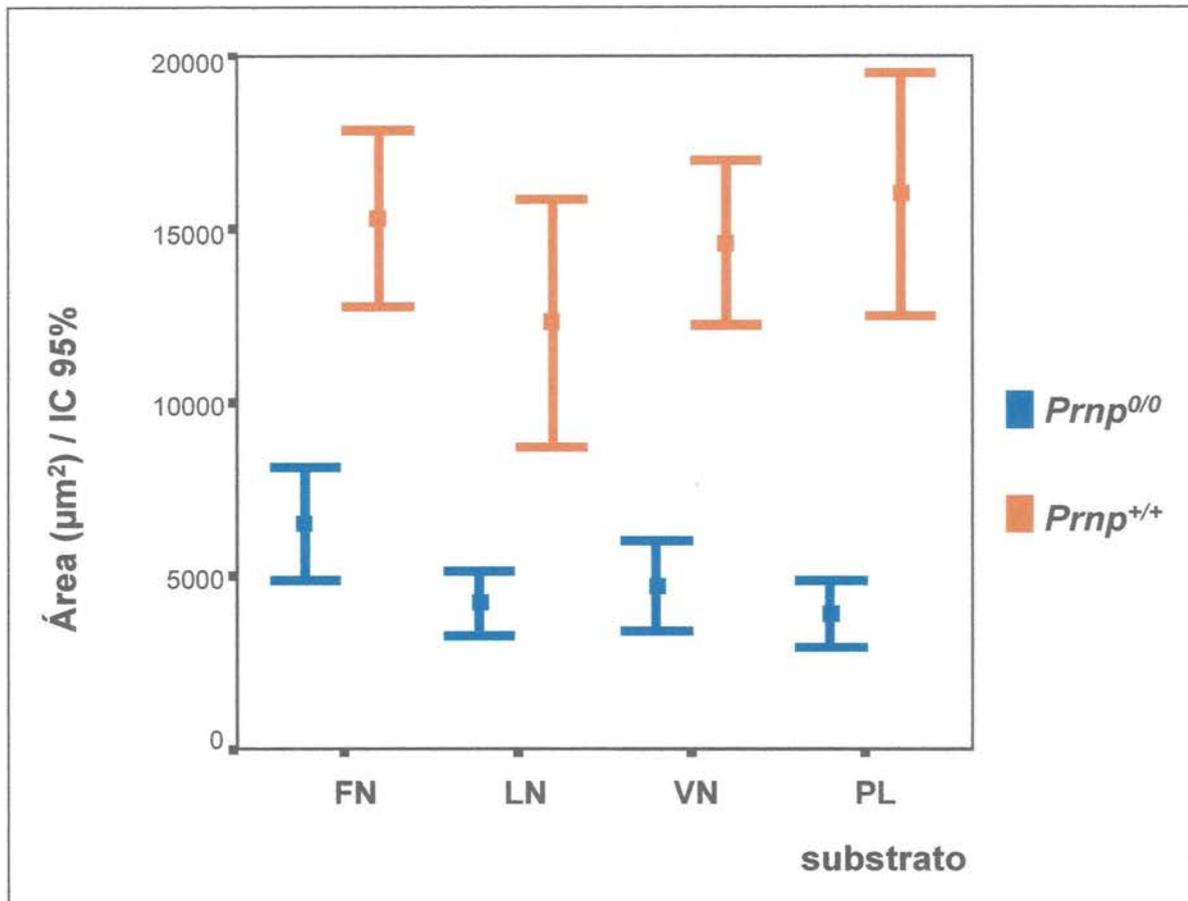


Legenda: Análises estatísticas evidenciam o comportamento migratório mais intenso dos esferóides *Prnp*^{0/0} (tons de azul) comparativamente aos *Prnp*^{+/+} (tons de laranja):

fibronectina (FN):	clone B3 ≠ T16, U14 e V12 (p<0,05), clone C5 ≠ T16, U14 e V12 (p<0,05);
laminina (LN):	clones B3, C5 e E10 ≠ V12 (p<0,05);
vitronectina (VN):	clone B3 ≠ T16, U14 e V12 (p<0,05), clone C5 ≠ T16, U14 e V12 (p<0,05), clone E10 ≠ U14 (p<0,05);
plástico (PL):	clone B3 ≠ T16, U14 e V12 (p<0,05), clone C5 ≠ U14 e V12 (p<0,05), clone E10 ≠ V12 (p<0,05).

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e análise de comparações múltiplas de Tukey.

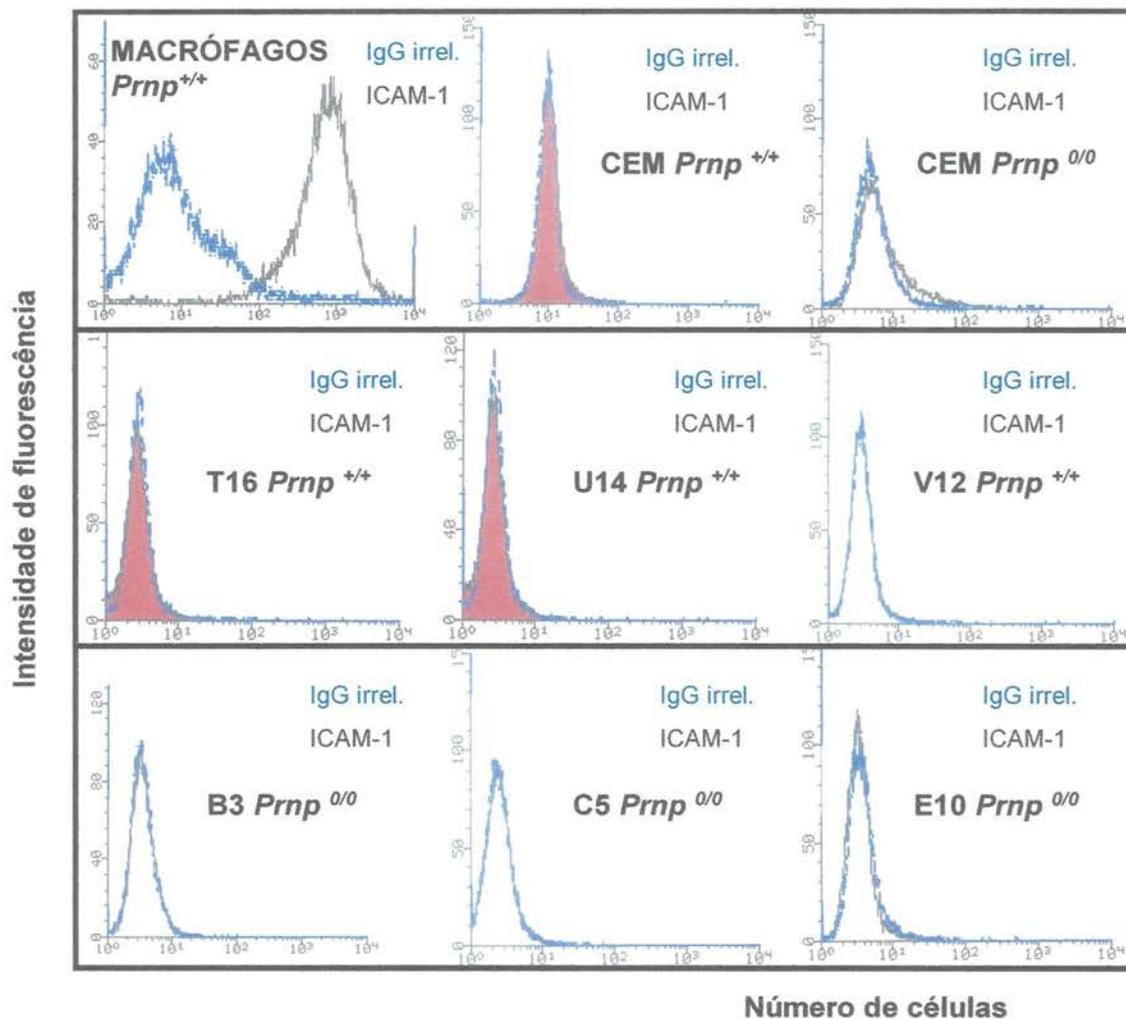
Figura 14 - Avaliação do tamanho dos halos formados pelos esferóides multicelulares de clones *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0} cultivados sobre proteínas da MEC.



Legenda: Os clones *Prnp*^{0/0} (em azul) exibem halo de migração de tamanho significativamente menor quando comparados aos halos produzidos pelos clones *Prnp*^{+/+} (em laranja), em qualquer substrato empregado. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e análise de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 15 - Avaliação do tamanho dos halos formados pelos esferóides multicelulares obtidos a partir do agrupamento dos três clones *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} cultivados sobre proteínas da MEC.

forma, é improvável que ICAM-1 possa ser associada a maior adesão célula-célula e, por conseqüência, aos resultados de colonização pulmonar.

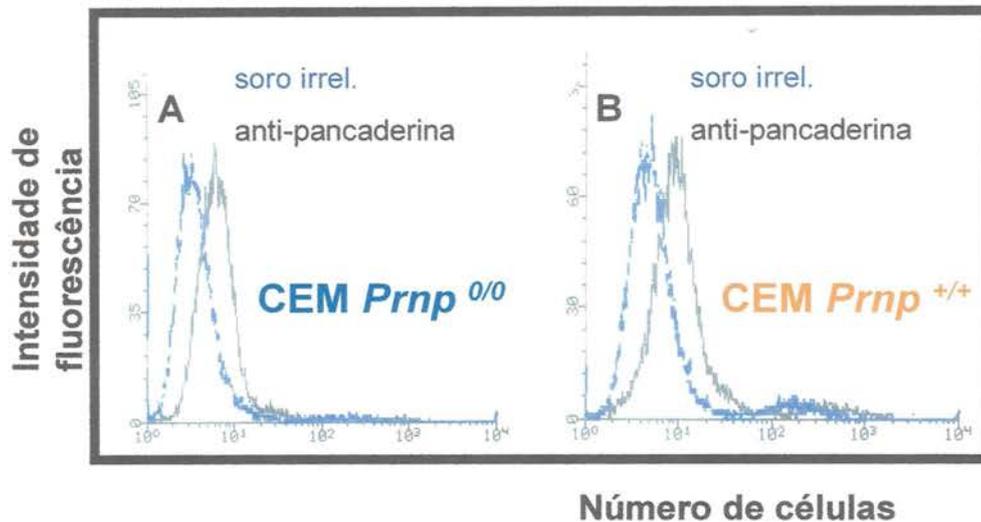


Legenda: Não há marcação específica produzida pelo anticorpo contra ICAM-1 quando comparada com a produzida por IgG irrelevante; foram utilizados macrófagos de camundongo tipo selvagem como controle positivo do experimento.

Figura 16 - Citometria de fluxo para detecção de ICAM-1 (CD-54) na superfície celular dos clones *Prnp*^{0/0} (B3, C5 e E10) e *Prnp*^{+/+} (T16, U14 e V12).

4.8.2 Expressão de caderinas

As caderinas são moléculas que participam da adesão célula-célula (VERMEULEN et al. 1995). Considerando a hipótese de que ocorra maior embolização entre células tumorais *Prnp^{0/0}*, levando a uma colonização pulmonar mais eficiente, a expressão aumentada destas moléculas poderia explicar tal fenômeno. Para tanto, testamos, por citometria de fluxo, os fibroblastos imortalizados parentais *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* que originaram os clones tumorais (Figura 17). Estas células foram escolhidas uma vez que partimos da hipótese de que a ausência de PrPc já modificaria a expressão das moléculas de adesão célula-célula na célula parental (antes da transformação). Empregamos um anticorpo contra pan-caderinas (E-caderina, N-caderina, P-caderina, V-caderina, R-caderina e T-caderina), o que permitiu a avaliação global da expressão dessas moléculas. Os resultados mostraram, entretanto, que não havia diferença entre as CEM *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* quanto a expressão dessas moléculas. Isto significa que as caderinas não parecem ser responsáveis pelas alterações entre os dois grupos de clones quanto a migração de células a partir dos esferóides e a capacidade de colonização pulmonar.



Legenda: Expressão de caderinas em células *Prnp*^{0/0} (A), e *Prnp*^{+/+} (B) avaliada por citometria de fluxo usando anticorpo para pan-caderinas (E-caderina, N-caderina, P-caderina, V-caderina, R-caderina e T-caderina). Linhas azuis mostram a fluorescência inespecífica do soro controle (não imune).

Figura 17 - Avaliação da expressão de caderinas em CEM *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+} imortalizados.

4.8.3 Expressão e atividade da integrina $\alpha_v\beta_3$:

Sabe-se que VN é ligante de PrPc (HAJJ et al. submetido). Ao mesmo tempo, VN interage com a integrina $\alpha_v\beta_3$ através do sítio RGD (PREISSNER 1991).

Esta integrina está classicamente associada a metástase e, recentemente, mostrou-se que células tumorais podem usar essa integrina para se ligar ao receptor de plaquetas, $\alpha_{IIb}\beta_3$, através da ligação cruzada com proteínas plasmáticas circulantes (PILCH et al. 2002). Sabe-se ainda que a proteína VN, ligante de integrina $\alpha_v\beta_3$ e de PrPc, possui a característica de formar multímeros (PREISSNER 1991; SCHVARTZ et al. 1999), o que facilitaria a formação de ligações intercelulares mediadas por

integrinas. Além disso, dados não publicados do grupo revelaram que a integrina $\alpha_v\beta_3$ tem atividade aumentada em neurônios de gânglios da raiz dorsal de animais *Prnp^{0/0}* (HAJJ et al. submetido). Isto significa que a ausência de PrPc (ligante de laminina e de vitronectina) leva a uma alteração na expressão ou atividade de integrinas em neurônios, o que pode ser um fenômeno generalizado para outras células.

Os experimentos de citometria de fluxo realizados para verificar a expressão de diversas integrinas revelaram que nas células parentais *Prnp^{0/0}* há uma expressão aproximadamente 30% maior da subunidade α_v do que nas *Prnp^{+/+}* ($p=0,02$), conforme visto na figura 18. Foram testadas ainda outras integrinas (como α_5 , α_6 , β_3 , β_4) que exibiram expressão semelhante entre as células *Prnp^{+/+}* e as *Prnp^{0/0}*.

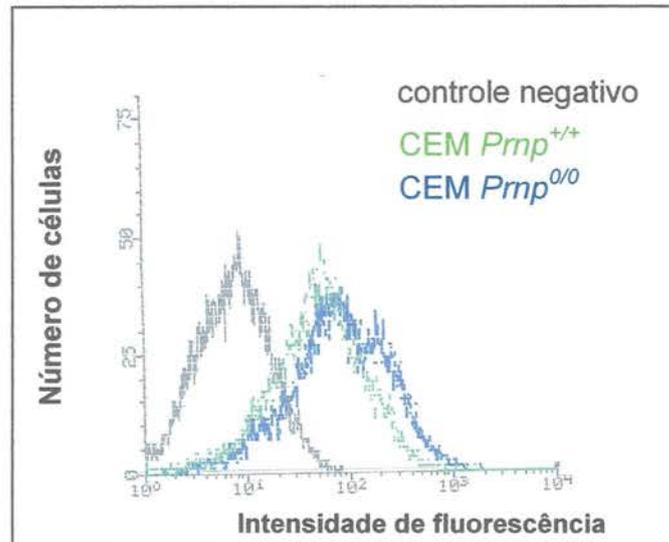
O próximo passo foi medir a atividade da integrina $\alpha_v\beta_3$ nas CEM *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* de cultura primária e nos respectivos clones transformados. Para isso foram realizados ensaios de imunofluorescência usando o anticorpo anti-wow-1 (PAMPORI et al. 1999), que reconhece especificamente a forma ativada desta integrina (figuras 19 e 20). A Figura 19 mostra que não existe diferença estatisticamente significativa quanto atividade da integrina $\alpha_v\beta_3$ entre as células parentais e respectivos clones *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}*.

Dada a grande variabilidade dos resultados obtidos nestes experimentos, decidimos aumentar a amostragem agrupando os dados relativos aos clones *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}*, o que ainda minimiza eventos clonais. Os resultados apresentados na Figura 20 comprovam que células *Prnp^{0/0}*

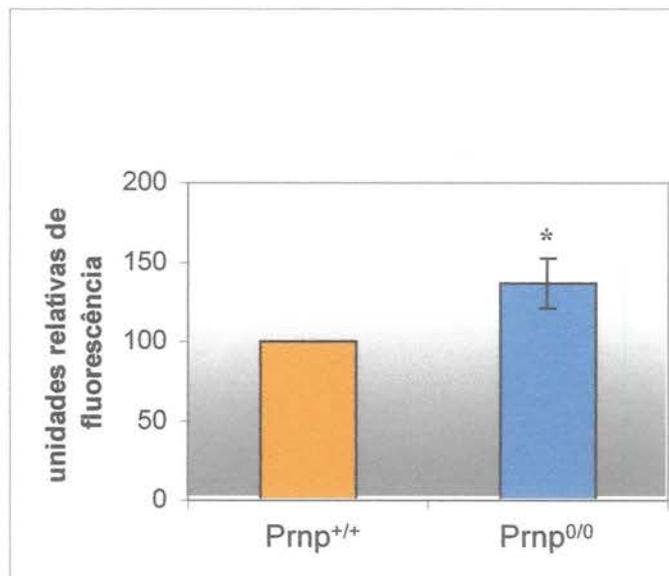
possuem atividade aumentada de $\alpha_v\beta_3$ quando comparadas a células *Prnp*^{+/+}.

Portanto, nossos dados sugerem que a maior capacidade de colonização pulmonar pelos clones de células *Prnp*^{0/0}, quando comparadas às *Prnp*^{+/+}, pode ser devida a sua maior habilidade de agregação o que deve ser causada, pelo menos em parte, pela maior atividade de $\alpha_v\beta_3$ nestas células.

A



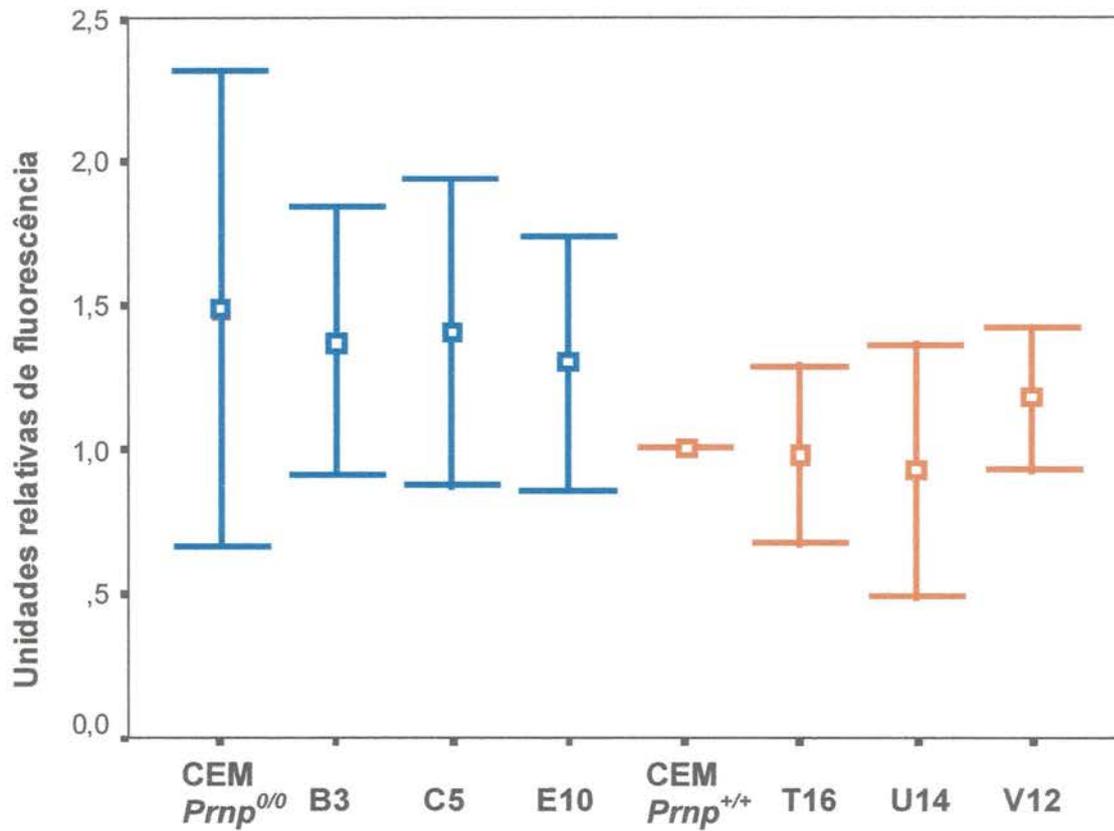
B



Legenda: A: expressão da subunidade α_v de integrina em fibroblastos $Prnp^{0/0}$ e $Prnp^{+/+}$ avaliada por citometria de fluxo. Soro não imune foi usado como controle.

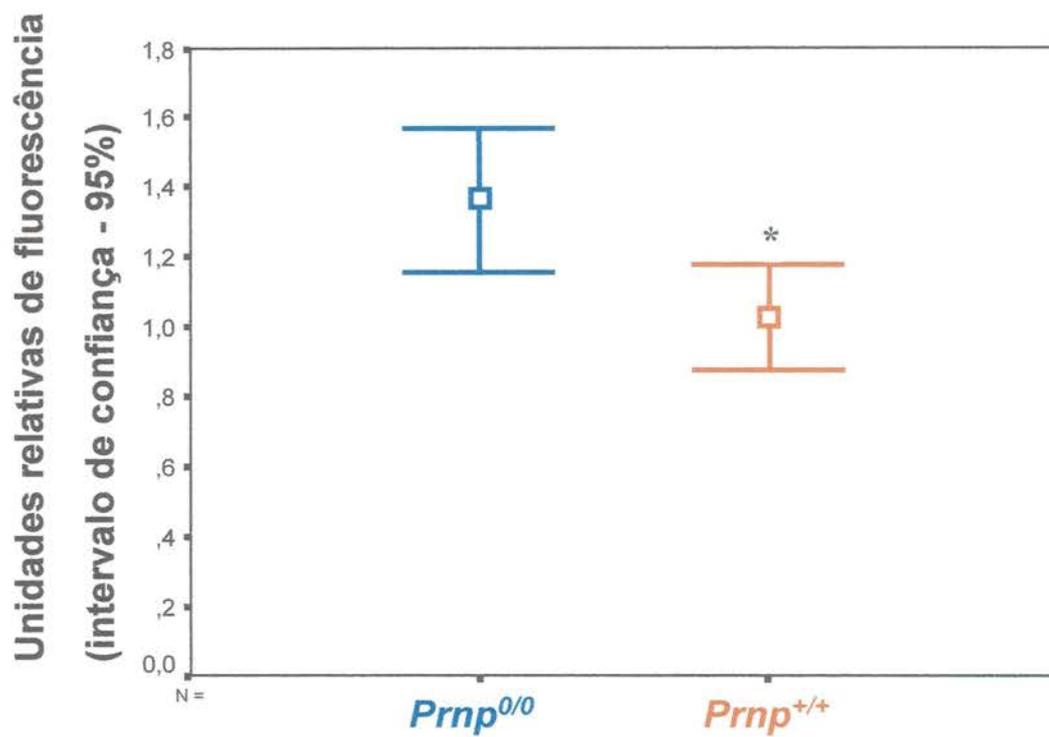
B: quantificação da expressão da subunidade α_v , onde unidades de fluorescência arbitrárias para as células $Prnp^{+/+}$ foram consideradas 100% e o valor para a célula $Prnp^{0/0}$ é relativo a este. * $p < 0,05$, teste t (Student's) de média única.

Figura 18 - Expressão da subunidade α_v de integrina em fibroblastos de cultura primária de camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$.



Legenda: Células parentais *Prnp*^{0/0} (azul) e *Prnp*^{+/+} (laranja) e os respectivos clones transformados foram avaliados pelo uso do anticorpo anti-wow-1, que reconhece especificamente a forma ativada da integrina $\alpha_v\beta_3$. As unidades de fluorescência arbitrárias foram consideradas igual a 1 para as células parentais *Prnp*^{+/+} e os valores para as outras células são relativos a este. Não se observaram diferenças estatísticas entre as linhagens quanto à ativação de $\alpha_v\beta_3$.

Figura 19 - Quantificação da ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$ por imunofluorescência.



Legenda: Clones celulares transformados *Prnp*^{0/0} (azul) ou *Prnp*^{+/+} (laranja) foram agrupados e suas unidades relativas de fluorescência foram comparadas. * $p=0,012$, teste de Mann-Whitney.

Figura 20 - Quantificação da ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$ por imunofluorescência.

5 DISCUSSÃO

5.1 GERAÇÃO DE CLONES, CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM E DE FATORES SOLÚVEIS

A natureza do complexo processo de múltiplos passos da tumorigênese pôde ser compreendida pelo uso de modelos de carcinogênese química em animais. Através do modelo murino de câncer de pele, caracterizou-se que a oncogênese envolve três passos denominados iniciação, promoção e progressão tumoral. A iniciação pode ser desencadeada por substâncias químicas mutagênicas, tais como o dimetilbenzantraceno (DMBA). A promoção decorre do uso de um agente promotor, como o éster de forból que, aplicado continuamente, leva ao surgimento de papilomas, e posteriormente, de carcinomas.

Uma vez gerado o tumor, alterações genéticas vão sendo acumuladas de maneira heterogênea na massa tumoral. A fase de progressão é decorrente da aquisição destas alterações, culminando num fenótipo mais agressivo, que freqüentemente depende da interação das células tumorais com células e elementos inanimados do hospedeiro (a matriz extracelular).

Mutações em proto-oncogenes, particularmente *myc*, determinam a iniciação e outras mutações em proto-oncogenes localizados na membrana e/ou citoplasma, como *ras*, determinam a promoção tumoral (MANZO 1989).

Assim, a natureza da tumorigênese (múltiplos passos) pode refletir a ativação de vários oncogenes consecutivamente (LAND et al. 1983; NEWBOLD e OVERELL 1983; THOMPSON et al. 1989). Animais transgênicos que expressam os oncogenes *ras* e *myc* sob o controle do promotor do vírus de carcinoma mamário de camundongos exibem uma maior incidência de carcinomas de mama que aqueles que expressam apenas um desses oncogenes (SINN et al. 1987). A introdução de dois oncogenes, como *ras* e *myc*, induz a transformação de células de culturas primárias de camundongo (HAHN e WEINBERG 2002; RANGARAJAN e WEINBERG 2003). Já em humanos, aparentemente, são necessários 5 a 6 eventos distintos, dependendo do modelo celular estudado, o que confirma estimativas dos primeiros estudos epidemiológicos sobre carcinogênese humana (PETO et al. 1975; RANGARAJAN et al. 2004).

O modelo apresentado neste estudo baseia-se na geração de clones a partir de CEMs imortalizadas, que expressam ou não a proteína PrPc, pela transfecção dos oncogenes *ras* e *myc*. Assim, a partir dos clones gerados podemos estudar o papel de PrPc em tumorigênese e metástase experimentais.

Os clones gerados, *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}*, foram avaliados quanto à expressão das oncoproteínas e exibiram quantidades semelhantes de Ras e Myc, de modo que quaisquer alterações no comportamento dessas células correlacionam-se necessariamente à presença ou não da proteína PrPc.

Inicialmente, verificamos que os clones *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}* apresentaram capacidade semelhante de proliferação em agar mole. A

capacidade de proliferação independente de ancoragem a um substrato apresentada por células transformadas é o parâmetro experimental que guarda melhor correlação com a capacidade tumorigênica dessas células em modelos animais (FREEDMAN e SHIN 1974). Esta característica reflete a tendência que as células tumorais possuem de sobreviver e crescer em sítios inapropriados, tal como ocorre na invasão e metástase. As células tumorais são resistentes à morte celular associada à perda de adesão à MEC ou “anoikis”, palavra grega para designar “sem casa” (SCHWARTZ 1997; MIRANTI e BRUGGE 2002).

As células normais necessitam de sinais emitidos por fatores de crescimento e seus receptores assim como da interação entre moléculas da superfície celular e da MEC para sua sobrevivência e regulação do ciclo celular. As integrinas exercem um papel de grande importância neste mecanismo, células não aderidas a proteínas da MEC entram em apoptose, mesmo quando cultivadas em condições onde não há deprivação de fatores de crescimento.

O escape da morte celular e da supressão da proliferação como consequência da perda das funções adesivas normais provavelmente está associado a progressão tumoral (EVAN e VOUSDEN 2001). Sabe-se que integrinas estão envolvidas na regulação de tirosina-quinases como FAK (“focal adhesion kinase”), pp60^{Src}, c-Abl, e serina-treonina-quinases, como MAPK, jun-quinase (JNK), PKA, PKC, entre outras proteínas. Fatores de crescimento solúveis, através de seus receptores, podem promover ativação sinérgica das mesmas vias de sinalização controladas por integrinas, através

da cascata Ras/Raf/Mek/MAPK. Assim, adesão mediada por integrinas e fatores solúveis atuam controlando funções celulares como migração, proliferação, expressão gênica e diferenciação, além de conferirem, em condições normais, dependência de ancoragem (SCHWARTZ 1997; MIRANTI e BRUGGE 2002).

Os clones celulares gerados neste trabalho crescem independente de fatores solúveis ou de ancoragem, graças à introdução dos oncogenes *ras* e *myc* nessas células.

As integrinas podem regular respostas a outros receptores e vice-versa, ocorrendo extenso “crosstalk” entre as vias de sinalização ativadas pelas primeiras e outros receptores. Através de mecanismo de transativação (Figura 21), receptores de fatores de crescimento são ativados. Receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor de fator de crescimento de hepatócitos (HGFR/Met) e Ron, receptor para proteína estimuladora de macrófagos, que guarda extensa homologia com Met, são todos estimulados após a ativação de integrinas, assim, amplificando o sinal destas. Também ocorre a ativação das integrinas através de fatores de crescimento, que alteram afinidade e avidéz destas por seus ligantes (TRUSOLINO et al. 2000; MIRANTI e BRUGGE 2002; COMOGLIO et al. 2003).

PrPc está localizado na membrana celular, o que sugere um mecanismo de “crosstalk” entre este e receptores de fatores de crescimento

que, juntamente com integrinas, regulariam e/ou modulariam essas vias de sinalização.

Observamos que ambos os grupos de clones, *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}*, exibiram capacidade de proliferação semelhante *ex vivo* (curvas de crescimento). Quando injetados subcutaneamente, os clones foram igualmente capazes de produzir tumores *in vivo*; além disso, os experimentos de dose tumoral mínima não mostraram diferenças entre os dois grupos de clones gerados. Portanto, a presença de PrPc não foi capaz de alterar a implantabilidade, proliferação ou manutenção das células *in vivo*, sugerindo que não há influência de PrPc quanto a independência de fatores de crescimento solúveis ou mesmo sobre a capacidade de proliferação independente de ancoragem.

As células imortalizadas parentais, as CEMs *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}*, não exibiram comportamentos diferentes durante a imortalização, sugerindo que não houve participação de PrPc nessa etapa. Não foi observada também a participação de PrPc nos processos de iniciação e promoção tumoral, uma vez que todos os clones, desde a sua geração, comportaram-se igualmente frente aos experimentos de dose tumoral mínima e de tumorigênese.

Colonização pulmonar

A malignidade tumoral reflete, entre outras características, a capacidade de produzir metástases. Estas se dão a partir de uma série de passos seqüenciais que resultam na formação de focos metastáticos

distantes do tumor primário. As células devem dissociar-se do tumor primário, migrar através da MEC, permear a membrana basal de vasos, atingindo a circulação sanguínea ou o sistema linfático. No órgão-alvo, o fenômeno inverso ocorre: evasão do sistema vascular (extravasão) e invasão da membrana basal (COUSSENS e WERB 1996).

Para estudar o possível envolvimento de PrPc no processo metastático, utilizamos o modelo experimental de colonização pulmonar, que contempla os processos finais do desenvolvimento de metástases, isto é, a fase intravascular, a extravasão e o escape de algumas defesas imunes (THORGEIRSSON et al. 1985; BERNSTEIN e WEINBERG 1985; GREIG et al. 1985).

Sabe-se que PrPc está associado a proteção contra estresse oxidativo e que células de origem neuronal obtidas de animais deficientes para PrPc exibem maior suscetibilidade a radicais livres e a outros insultos ligados ao aumento do estresse oxidativo, como tratamentos com dimetilsulfóxido, citarabina, dissulfiram, ácido caínico, entre outros (BROWN et al. 1997b). Foi observado ainda o aumento da expressão de Bax, Bcl-2 e de ERK fosforilada e diminuição de p53 em culturas de neurônios cerebelares de camundongos adultos cujo gene de PrPc foi removido (BROWN et al. 2002). Assim, a expectativa inicial era de que os clones de células tumorais *Prnp^{0/0}* produzissem tumores menos eficientemente, nos experimentos de colonização pulmonar, exibindo menor sobrevivência ao estresse representado pela disseminação hematogênica. No entanto, os dados apresentados mostraram exatamente o oposto.

Embora os clones estudados tenham exibido curvas de crescimento semelhantes, este comportamento não se refletiu nos experimentos de colonização pulmonar, onde os clones *Prnp^{0/0}* produziram número de colônias superior ao dos clones *Prnp^{+/+}*. Assim, os dados obtidos nos experimentos de colonização pulmonar não podem ser explicados com base no crescimento celular.

Para explicar o maior número de colônias pulmonares gerado por clones *Prnp^{0/0}* nesse experimento algumas hipóteses foram formuladas, como descrito a seguir.

- ***Organização da matriz extracelular***

Análises feitas por microscopia confocal revelaram que colônias de células de carcinoma SP1 continham microfibrilas extracelulares compostas de fibronectina. A depleção parcial de fibronectina em culturas em ágar mole reduziu o número de colônias obtido. Por outro lado, o número de colônias pôde ser recuperado adicionando-se fibronectina exógena. Portanto, este achado indica que a deposição de fibronectina no padrão fibrilar é necessária, embora não seja suficiente, para o crescimento independente de ancoragem da linhagem de carcinoma mamário SP1, em ensaios de crescimento em ágar mole (SAULNIER et al. 1996).

Mostrou-se que o peptídeo da cadeia $\beta 1$ da molécula de laminina YIGSR reduz a metástase experimental, quando co-injetado com células HT1080 de fibrossarcoma humano (IWAMOTO et al. 1996).

Uma linhagem celular foi estabelecida pela seleção em cultura de células de melanoma murino B16-F10 que aderiam mais fortemente a placas tratadas com o peptídeo YIGSR. Essa variante celular foi capaz de produzir um número mais elevado de colônias pulmonares após injeção intravenosa que suas parentais. Este achado sugere que a interação celular com essa seqüência da molécula de laminina pode regular o crescimento tumoral. Outro dado, refere-se à inibição da colonização pulmonar quando as células são co-injetadas com formas multiméricas do peptídeo YIGSR, onde se mostrou que quanto maior o tamanho do multímero, maior a proteção contra a formação de colônias pulmonares (NOMIZU et al. 1993).

Por outro lado, nosso grupo observou em culturas primárias de glia, que na MEC produzida por células *Prnp^{0/0}*, a LN apresentou padrão pontual de deposição, enquanto que nas células *Prnp^{+/+}*, a LN exibiu padrão fibrilar (LIMA et al. em preparação). Assim, levantou-se a hipótese da participação de uma forma alterada de organização da matriz extracelular relacionada à capacidade de produção de colônias pulmonares. Isto poderia ocorrer no momento em que a célula é injetada, carregando parte da matriz à qual se encontrava aderida, resultando numa maior ou menor eficiência na colonização do epitélio pulmonar. Outra possibilidade seria, no momento posterior, que a diferença na organização da matriz pudesse interferir na interação da célula tumoral com o endotélio. Isto poderia significar uma melhor ou pior fixação no sítio metastático, com conseqüente maior ou menor colonização, respectivamente.

O padrão de deposição das proteínas de MEC, FN e LN, depositada pelas CEM parentais *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* foi estudado por imunofluorescência. No entanto, nas CEMs estudadas não se identificou tal diferença. Portanto, não parece haver correlação entre o padrão de deposição das proteínas FN e LN nas matrizes produzidas pelas CEMs *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* e os resultados obtidos na metástase experimental.

- ***Atividade de metaloproteinases (MMPs) de matriz extracelular***

A expressão de metaloproteinases pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos incluindo fatores de crescimento, citocinas e componentes da MEC.

A atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9), por exemplo, regula a biodisponibilidade e atividade de fatores de crescimento e citocinas, afetando a resposta imune e o processo de angiogênese (JOHN e TUSZYNSKI 2001).

As MMPs exercem um papel fundamental na metástase, promovendo invasão e angiogênese. Em particular, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) têm se mostrado importantes no processo metastático em diversos tumores humanos e também em modelos animais de tumor.

Alguns inibidores sintéticos de MMPs, como Batimastat e Marimastat, inibem a atividade das MMPs e, portanto, inibem a formação de capilares *in vivo* e *in vitro* (TARABOLETTI et al. 1995). A maior evidência, no entanto, associando MMP-2 ao processo angiogênico se deu através do camundongo

deficiente para MMP-2, que exibiu angiogênese tumoral reduzida. Esse animal, depois de injeções intradérmicas de células de melanoma e de tumor de Lewis, produziu volume tumoral diminuído de 39% e 24%, respectivamente, em relação ao controle (ITOH et al. 1998).

Em trabalho recente, foi reportado que o inibidor de metaloproteinases ONO-4817 foi capaz de bloquear a metástase hematogênica em camundongos imunodeficientes, reduzindo o número de colônias pulmonares formadas após a injeção de células tumorais (YAMAMOTO et al. 2003). Também a oxamflatim, um derivado do ácido hidroxâmico, que inibe a expressão de ativador de plasminogênio tipo-uroquinase e eleva a expressão do inibidor de ativador de plasminogênio tipo-uroquinase, atua inibindo a invasão de células metastáticas através de matrigel (CAKAROVSKI et al. 2004).

Mostrou-se recentemente em células hepáticas humanas (human stellate cells) que a ligação entre uma proteína do vírus de hepatite C, E2, e CD81 leva ao aumento da expressão de MMP-2, mediado pela via de MAPK/ERK (MAZZOCCA et al. 2004). Sabe-se que MAPK está mais ativada em explantes de retina (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002) e hipocampo de embriões de camundongos deficientes de PrPc (LOPES et al. submetido), e em neurônios cerebelares de camundongos adultos deficientes de PrPc (BROWN et al. 2002). Estes dados nos levaram a hipotetizar que clones tumorais deficientes de PrPc poderiam produzir e/ou ativar gelatinases mais eficientemente que os respectivos clones selvagens. Desta forma, foram conduzidos experimentos de zimografia a partir de meios

condicionados dos clones *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0} em células em cultura. No entanto, o estado de ativação dessas metaloproteinases mostrou-se semelhante entre todos os clones, não podendo portanto, correlacionar-se com os efeitos observados na colonização pulmonar.

- ***Aumento da agregação e embolização de células tumorais***

Em publicação recente, descreveu-se um possível papel de PrPc mediando adesão intercelular (MANGE et al. 2002). Foi mostrado que células de origem neuronal que superexpressam PrPc exibem capacidade aumentada de formar agregados e que o tratamento com fosfolipase C fosfatidilinositol-específica ou com anticorpos contra PrPc diminuem tal capacidade (MANGE et al. 2002). O fenômeno de agregação celular é de fundamental importância no mecanismo envolvido na metástase e, em particular, no ensaio de colonização pulmonar. No entanto, contrariamente às expectativas iniciais, a ausência da proteína PrPc pareceu exercer um papel positivo na capacidade de colonização pulmonar.

Moléculas envolvidas em adesão célula-célula podem eventualmente exibir expressão e/ou ativação alteradas na ausência de PrPc. Isto poderia ocorrer em função de mecanismo compensatório desenvolvido para prevenir possíveis alterações no funcionamento normal da célula deficiente para PrPc, através da utilização de proteínas envolvidas no mesmo fenótipo, com funções redundantes. Diversos exemplos desse fenômeno podem ser vistos na literatura (SCHWARZ et al. 2002; FRIEDRICHSEN et al. 2002;

SCHLUTER et al. 2004). Assim, algumas moléculas de adesão célula-célula foram estudadas.

A adesão célula-célula determina a polaridade das células, participa na manutenção da estrutura tecidual e regula proliferação e diferenciação. Essas interações são mediadas por uma grande família de moléculas chamadas de CAMs ("cellular adhesion molecules"). Um grupo de CAMs, as caderinas compreendem uma superfamília de glicoproteínas transmembrana dependentes de Ca^{2+} que executam papéis essenciais no contato célula-célula. A regulação da adesão célula-célula mediada por caderinas é importante no desenvolvimento embrionário e na diferenciação (STEWART e NELSON 1997; UEMURA 1998).

O domínio extracelular de várias caderinas é responsável pela interação homofílica na adesão célula-célula e os domínios citoplasmáticos interagem com proteínas citoplasmáticas denominadas cateninas, que se associam ao citoesqueleto de actina. Células tumorais que apresentam α -catenina mutada ou menos expressa em geral exibem maior potencial invasivo (VERMEULEN et al. 1995). Muitos tumores de origem epitelial perdem a expressão do gene supressor de tumor E-caderina durante seu desenvolvimento. A E-caderina atua como molécula supressora de metástases em muitas linhagens celulares e a perda da sua expressão correlaciona-se com elevado potencial de invasão e de metástase, enquanto que a reintrodução ou o aumento da expressão do gene leva a supressão do fenótipo invasivo (VLEMINCKX et al. 1991; SEMB e CHRISTOFORI 1998; PECINA-SLAUS 2003).

Assim, foram realizados experimentos de citometria de fluxo para avaliação da expressão de caderinas sem que se observassem, no entanto, alterações entre as células parentais *Prnp^{+/+}* e *Prnp^{0/0}*. Portanto, caderinas provavelmente não estão envolvidas com a maior adesão célula-célula que pudesse explicar a maior produção de colônias pulmonares pelos clones *Prnp^{0/0}* relativamente aos clones *Prnp^{+/+}*.

Também estudamos a participação de outra molécula de adesão célula-célula, a ICAM-1 (“intercellular adhesion molecule”). Experimentos conduzidos pelo Dr. Tarso Benigno Ledur Kist, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, evidenciaram em “microarrays” de cDNA, uma maior expressão do mRNA de ICAM-1 em cérebros de camundongos *Prnp^{0/0}* quando comparados aos *Prnp^{+/+}*. Assim, supusemos que esta molécula poderia ser responsável pela maior embolização e conseqüentemente pela maior colonização pulmonar, entre os clones *Prnp^{0/0}*.

As ICAMs são membros estruturalmente assemelhados à família das imunoglobulinas, e são ligantes da cadeia $\beta 2$ das moléculas de integrinas (HUBBARD et al. 2000; DIETRICH 2002).

ICAM-1 está mais expressa em células de pacientes com carcinoma pulmonar de pequenas células sendo responsável por mau prognóstico, além disso, a adesão de células tumorais a células endoteliais em cultura é dependente de ICAM-1 (FINZEL et al. 2004). A maior expressão desta molécula poderia também explicar nossos dados de colonização pulmonar. No entanto, em ambos os grupos de clones, a expressão de ICAM-1 não foi detectável através de experimentos de citometria de fluxo. Portanto,

alterações na expressão de ICAM-1 não estão envolvidas com os dados de colonização pulmonar obtidos no presente trabalho.

O processo de embolização de células tumorais é um outro aspecto importante no experimento de colonização pulmonar e é facilitado por plaquetas, que podem formar agregados juntamente com as células tumorais, mediando a adesão à parede de capilares e protegendo células tumorais circulantes da ação da resposta anti-tumoral do hospedeiro mediada por linfócitos “natural killer” (NIESWANDT et al. 1999). Os leucócitos podem igualmente participar deste processo, protegendo as células tumorais circulantes e favorecendo a metástase (KARPATKIN et al. 1981). Estes processos podem levar a uma colonização pulmonar mais eficiente. Além disso, as plaquetas liberam uma variedade de agentes angiogênicos como VEGF, PDGF, TGF- β e fibrinogênio. Estes fatores são liberados imediatamente após a ativação plaquetária, que pode ocorrer pela presença de células tumorais (TRIKHA e NAKADA 2002; TRIKHA et al. 2002).

É provável ainda que a ausência de PrPc atue modulando a expressão ou ativação de algum receptor celular envolvido neste processo. Outro experimento que corrobora esta hipótese é o que avaliou o comportamento de esferóides multicelulares frente a componentes da MEC. Estes sugerem que as células dos clones *Prnp*^{0/0} tendem a permanecer sob a forma de agregados, migrando menos em direção às proteínas de matriz extracelular imobilizadas na placa de cultura. Ao contrário das células dos clones *Prnp*^{+/+} que, nas mesmas condições, tendem a migrar mais

ativamente. Portanto, moléculas responsáveis por agregação de células, em particular na corrente sanguínea, são fortes candidatas no desenvolvimento de um maior número de colônias pulmonares pelos clones *Prnp^{0/0}*.

Integrinas e metástase

As integrinas são uma grande família de receptores que medeiam os processos celulares de adesão e migração.

Estas são heterodímeros de glicoproteínas formadas por uma unidade α , entre 18, e uma unidade β , entre oito conhecidas que, combinadas, produzem no mínimo 24 diferentes integrinas. Cada integrina pode associar-se a um repertório de ligantes da superfície celular, da MEC ou ainda a proteínas solúveis (HYNES 1992; SCHWARTZ et al. 1995).

Células transfectadas com a porção catalítica de Raf-1, que integra a via de sinalização controlada por integrinas, mostraram aumento na expressão da subunidade α_v (ZHANG et al. 2002). Uma vez que α_v está relacionada a aumento da agregação celular (AOSHIBA et al. 1997), mostrou-se ainda que as células que receberam a construção possuem maior capacidade de formar agregados. Assim, sabendo que Raf-1 regula MAPK e que esta última se apresenta mais ativada em células de origem neuronal em animais deficientes para PrPc (BROWN et al. 2002), seria razoável supor que a expressão de α_v estivesse aumentada nas células desses animais. De fato, experimentos de citometria de fluxo mostraram que há maior expressão de α_v nas CEM *Prnp^{0/0}* que nas *Prnp^{+/+}*.

Também foi reportado que dominantes negativos de Mek 1 ou Raf-1 inibem a ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ a fibrinogênio em plaquetas (LI Z et al. 2001). Outro trabalho mostrou a associação entre MAPK (ERK1) e a integrina $\alpha_v\beta_3$ após a adição de PDGF a fibroblastos NIH 3T3 submetidos a deprivação de soro. ERK1 imunoprecipita juntamente com a integrina $\alpha_v\beta_3$, empregando anticorpo contra a subunidade β_3 , e co-localizam-se na membrana plasmática. O tratamento dessas culturas com PD98059, um inibidor de MEK (que está “upstream” a ERK1, nessa via), inibiu a co-immunoprecipitação e a co-localização de ERK1 e $\alpha_v\beta_3$ e, ao mesmo tempo, foi capaz de inibir em 40% a adesão dessas culturas a VN, mas não sobre FN, indicando que $\alpha_v\beta_3$ recruta ERK1 para aderir eficientemente sobre VN, o que implica a participação de ERK1 na ativação de $\alpha_v\beta_3$ (ROBERTS et al. 2003).

Sabe-se que a metástase freqüentemente envolve a circulação sangüínea e que as células tumorais circulantes estão expostas a forças do fluxo sangüíneo, que se opõem à ancoragem das células tumorais. No entanto, a retenção das células tumorais no compartimento vascular (metástase hematogênica) é fundamental para o crescimento intravascular do tumor e para a extravasão, atingindo os órgãos-alvo da metástase. Além disso, esta é dependente, entre outras coisas, de mecanismos adesivos específicos e podem envolver a participação de plaquetas ativadas (PILCH et al. 2002). A atividade procoagulante de células tumorais tem sido correlacionada com a progressão de vários tipos de cânceres humanos (KARPATKIN et al. 1981 e 1988; CAMERER et al. 2004).

As plaquetas parecem exercer ainda um papel protetor contra a ação de linfócitos “natural killer”. Mostrou-se que anestésicos como cetamina, tiopental e halotano, reduziram a ativação de linfócitos “natural killer” em modelos animais de metástase experimental, levando a uma maior eficiência na colonização pulmonar experimental de células tumorais. Assim, a redução na ativação de células “natural killer” pode correlacionar-se a maior suscetibilidade à metástase nesse modelo (MELAMED et al. 2003).

Camundongos deficientes para *Gαq*, proteína G crítica para a ativação plaquetária, exibem pronunciada diminuição na metástase experimental e espontânea, evidenciando o papel que as plaquetas ativadas exercem, favorecendo a disseminação hematogênica de células tumorais. A redução da sobrevivência das células tumorais circulantes em camundongos deficientes para *Gαq* e fibrinogênio não foi observada quando da depleção genética ou imunológica de linfócitos “natural killer”, sugerindo que plaquetas e fibrina exerçam papel protetor contra a ação desses linfócitos, contribuindo para um maior potencial metastático impedindo a eliminação de células tumorais (PALUMBO et al. 2005).

Considerando-se a possibilidade de PrPc mediar ligação célula-célula (MANGÉ et al. 2002) e sabendo-se que células “natural killer” expressam PrPc em camundongos, ao contrário das plaquetas (STARKE et al. 2000), poderia-se imaginar que, em animais tipo selvagem que receberam clones *Prnp*^{+/+} ocorreria uma maior interação entre estes linfócitos e células tumorais, favorecendo a eliminação destas últimas. O que não ocorreria, entretanto, em animais tipo selvagem que receberam clones *Prnp*^{0/0}, onde a

interação entre as células tumorais *Prnp*^{0/0} e os linfócitos “natural killer” *Prnp*^{+/+} talvez fosse prejudicada pela ausência da interação célula-célula mediada por PrPc (MANGE et al. 2002). Além disso, essa interação também pode ser menos eficiente devido à maior proteção conferida pelas plaquetas, mediada pela ligação cruzada entre $\alpha_v\beta_3$ ativada nas células *Prnp*^{0/0} e $\alpha_{IIb}\beta_3$ nas plaquetas.

A função fundamental das integrinas é a de ligação, que é em muitos casos rapidamente regulada num processo de ativação ou “inside-out signaling”. A ativação de integrinas se dá por dois eventos, pela modulação da afinidade do receptor através de mudanças conformacionais no heterodímero $\alpha\beta$ e pela modulação da avidéz do receptor através da difusão lateral ou agrupamento dos heterodímeros. Além disso, uma característica notável da ativação de integrinas é a capacidade de ligar-se a ligantes solúveis.

A evidência de que gânglios da raiz dorsal oriundos de camundongos deficientes para PrPc exibem a integrina $\alpha_v\beta_3$ 30% mais ativada que os animais tipo selvagem, num mecanismo compensatório (HAJJ et al. submetido), levou-nos a supor que o mesmo pudesse ocorrer entre os clones *Prnp*^{0/0} frente aos *Prnp*^{+/+}.

Quando se avaliou o estado de ativação de $\alpha_v\beta_3$ integrina, identificou-se uma maior ativação desta entre os clones *Prnp*^{0/0} que naqueles *Prnp*^{+/+}. Este achado associado ao que mostrou que a subunidade α_v está mais expressa nas células *Prnp*^{0/0} pode explicar o fenômeno observado na

colonização pulmonar, uma vez que dados da literatura mostram o envolvimento de $\alpha_v\beta_3$ em metástase (TRIKHA et al. 2002).

A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, frequentemente chamada de receptor de fibrinogênio está presente exclusivamente em megacariócitos e plaquetas, e é requerida para a agregação plaquetária através da interação com o sítio RGD presente em ligantes como fibrinogênio e fator de von Willebrand. A integrina $\alpha_v\beta_3$ é expressa em plaquetas, células endoteliais proliferantes, certas populações de leucócitos, células tumorais, entre outras e liga-se aos mesmos ligantes de $\alpha_{IIb}\beta_3$ além de outros, como osteopontina e MMP-2 (PAMPORI et al. 1999; SHATTIL 1999; TRIKHA et al. 2002).

Foi mostrado que células tumorais podem usar $\alpha_v\beta_3$ para se ligar ao receptor de plaquetas, $\alpha_{IIb}\beta_3$, através da ligação cruzada com proteínas plasmáticas circulantes (FELDING-HABERMANN et al. 1996; PILCH et al. 2002). Sabe-se ainda que a proteína vitronectina, ligante de integrina $\alpha_v\beta_3$ e de PrPc, possui a característica de formar multímeros (PREISSNER 1991; SCHVARTZ et al. 1999), o que facilitaria a formação de ligações intercelulares mediadas por integrinas, além disso, é amplamente conhecido o envolvimento da integrina $\alpha_v\beta_3$ em processos metastáticos (FELDING-HABERMANN et al. 1996; PILCH et al. 2002).

A integrina $\alpha_v\beta_3$ pode ainda se ligar a fibronectina e fibrinogênio, sendo que este último atua disparando a cascata da coagulação e ativando plaquetas. O fibrinogênio e outras proteínas solúveis multivalentes ligantes de $\alpha_v\beta_3$ suportam a coesão de células tumorais e plaquetas associadas a proteínas da MEC durante o fluxo sanguíneo (FELDING-HABERMANN et al.

1996). Assim, a integrina seria mais eficiente que PrPc na formação de êmbolos, facilitando a metástase, explicando o comportamento mais agressivo das células *Prnp*^{0/0}.

Foi mostrado recentemente que MAPK (Erk1) se associa com a integrina $\alpha_v\beta_3$ e regula adesão a vitronectina (ROBERTS et al. 2003). Assim, se MAPK está mais ativada em animais deficientes para PrPc é provável que isto se reflita numa maior ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$ nas células *Prnp*^{0/0}, levando a uma maior ligação à VN do plasma e também a outros ligantes plasmáticos, como o fibrinogênio, novamente favorecendo as interações que medeiam a formação de êmbolos e a agregação de plaquetas, explicando a capacidade de agregação maior nas células deficientes de PrPc.

O comportamento de esferóides multicelulares frente a componentes da MEC parece corroborar a hipótese acima. Nos experimentos realizados com esferóides multicelulares, as células dos clones *Prnp*^{0/0} tenderam a permanecer mais tempo sob a forma de esferóide, migrando menos em direção às proteínas de matriz extracelular imobilizadas na placa de cultura do que as células dos clones *Prnp*^{+/+}, nas mesmas condições. Moléculas responsáveis por adesão intercelular estariam mais ativadas ou mais expressas nas células *Prnp*^{0/0}.

É possível que a retirada do gene de PrPc ou ainda a diminuição de sua expressão desregule outros genes, aumentando a capacidade metastática de células tumorais.

Estudos independentes identificaram um fator responsável por motilidade celular, chamado de "scatter factor" (SF), idêntico ao HGF (fator

de crescimento de hepatócitos). HGF/SF é capaz de submeter certos tipos celulares à morfogênese quando suspensas em uma matriz semi-sólida. Assim, outra razão determinante do fenótipo de maior agregação/embolização celulares pode estar relacionada à ação de HGF/SF (“hepatocyte growth factor/scatter factor”).

C-met, que codifica o receptor de HGF/SF, MET, desencadeia todas as respostas conhecidas a HGF/SF. Foi inicialmente identificado como oncogene em linhagem de osteosarcoma humano. É um proto-oncogene expresso em uma grande variedade de tecidos e tipos celulares, cujas maiores concentrações são encontradas em células epiteliais. HGF exibe uma grande variedade de atividades biológicas, é mitógeno para diversas células epiteliais e endoteliais, desencadeando ainda motilidade e morfogênese (GHERARDI et al. 1993; TAMAGNONE e COMOGLIO 1997).

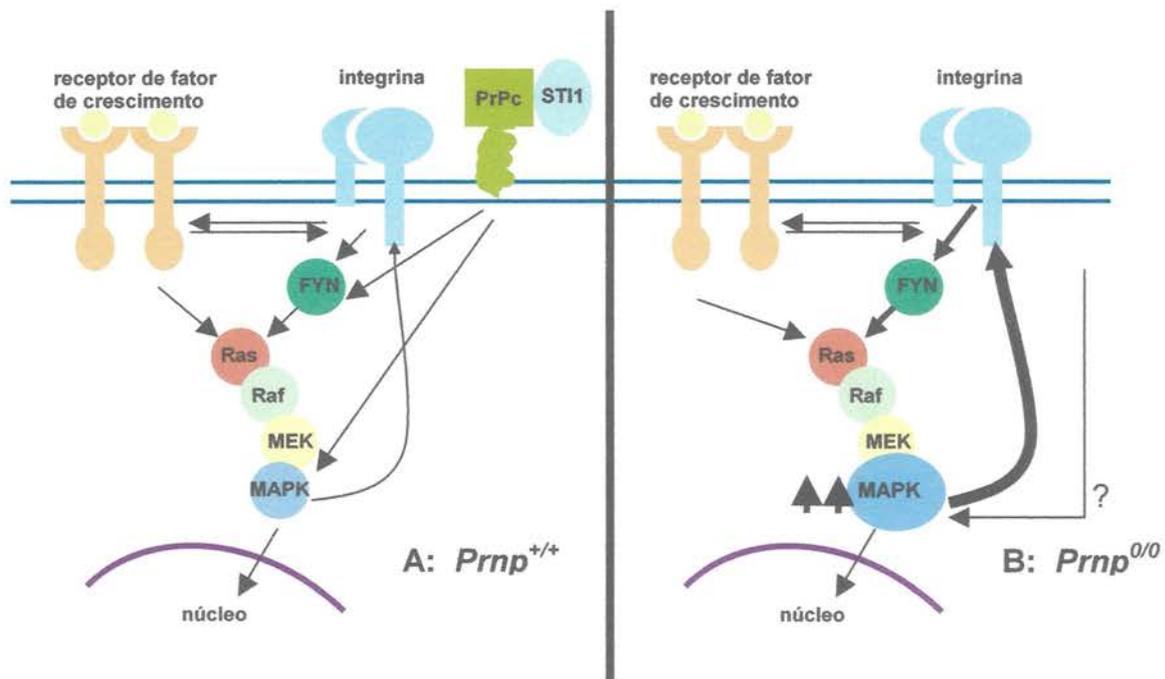
Assim, é possível que no modelo de cultura celular de esferóides multicelulares a maior tendência entre os clones *Prnp^{0/0}* de permanecer em forma de esferóides (maior agregação e menor motilidade) quando cultivados sobre cobertura de proteínas da matriz extracelular esteja relacionada a diferentes respostas à sinalização desencadeada por HGF/SF. Além disso, adesão celular mediada por integrinas pode ativar o receptor MET, desencadeando a sinalização para o mecanismo envolvido em metástase (GHERARDI et al. 1993; TAMAGNONE e e COMOGLIO 1997; MIRANTI e BRUGGE 2002). O envolvimento de SF/receptor Met não foi alvo de estudos no presente trabalho, entretanto, possíveis modificações

causadas pela ausência de PrPc neste receptor merecem estudos posteriores.

A integrina $\alpha_v\beta_3$ parece ser um forte candidato para mediar o evento observado nos experimentos de colonização pulmonar e de esferóides multicelulares, tendo se apresentado mais ativada e sabidamente estando envolvida em mecanismos de metástase. Este achado pode ser relevante na melhor compreensão dos mecanismos metastáticos. É possível que a ausência ou a diminuição na expressão de PrPc leve a um fenômeno compensatório, com a conseqüente maior ativação de $\alpha_v\beta_3$, levando a maior formação de êmbolos celulares na corrente sangüínea dos animais que receberam células *Prnp^{0/0}* e na produção de metástases pulmonares.

Por outro lado, é possível que $\alpha_v\beta_3$ esteja na via de sinalização de PrPc, o que levaria a alterações nesta integrina (expressão e/ou ativação), em função de variações na expressão de PrPc, que pode atuar, em última instância, modulando a atividade de MAPK (Figura 21).

Os resultados obtidos neste trabalho parecem relevantes, uma vez que a diminuição da expressão de PrPc poderia estar associada a metástase em tumores humanos. Este estudo, portanto, abre novas fronteiras para a avaliação de PrPc em doenças não relacionadas a prions. Portanto, a importância fisiológica de PrPc ganha maior destaque e os mecanismos patológicos associados com perda de função de PrPc passam a ser significativos.



Legenda: A: na célula *Prnp*^{+/+} a interação da integrina $\alpha_v\beta_3$ com receptores de fatores de crescimento ativa a via de Fyn-quinase e Ras, que tem MAPK como alvo. PrPc foi descrito por sinalizar, usando a via de Fyn-quinase e, além disso, sua interação com STI-1 induz a atividade de MAPK;

B: na célula *Prnp*^{0/0}, a ausência de PrPc leva a um aumento na expressão da subunidade α_v ; por mecanismos ainda desconhecidos, a atividade de MAPK está aumentada em células *Prnp*^{0/0} de origem neuronal, o que pode levar ao aumento da atividade da integrina $\alpha_v\beta_3$ que, por sua vez, contribui para uma maior atividade de MAPK.

Figura 21 - Representação esquemática do possível mecanismo de ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$ mediado pela ausência de PrPc.

6 CONCLUSÕES

1. PrPc não interfere nas fases de iniciação e promoção tumoral no modelo estudado;
2. A ausência de PrPc confere aumento na capacidade de colonização pulmonar, sugerindo envolvimento nas interações célula-célula que ocorrem ao longo da progressão tumoral

O aumento da capacidade de colonização pulmonar pela ausência de PrPc correlaciona-se com:

- o aumento da agregação celular no sistema circulatório,
- a menor desagregação celular em superfícies sólidas, cobertas ou não com elementos da matriz extracelular,
- o estado funcional mais ativado da integrina $\alpha_v\beta_3$, sugerindo mecanismo compensatório para a ausência de PrPc. É possível ainda que a integrina $\alpha_v\beta_3$ integre a via de sinalização de PrPc e que sua ausência regule esta via.

No entanto, o aumento da capacidade de colonização pulmonar pela ausência de PrPc não exibiu correlação com:

- produção/ativação de MMP-2 e MMP-9 (gelatinases A e B) induzida pelos oncogenes *ras* e *myc*;
- organização da deposição de LN e FN, sugerindo que as CEM *Prnp^{0/0}* e *Prnp^{+/+}* reconheçam igualmente a MEC,
- as moléculas de adesão intercelular ICAM-1 e caderinas;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. **Cell** 2004; 116:313-27.

Alonso DF, Skilton G, Farias EF, Bal de Kier JE, Gomez DE. Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. **Breast Cancer Res Treat** 1999; 57:271-5.

Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. **Biochem Biophys Res Commun** 1966; 22:278-84.

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? **Nature** 1967; 214:764-6.

Aoshiba K, Rennard SI, Spurzem JR. Cell-matrix and cell-cell interactions modulate apoptosis of bronchial epithelial cells. **Am J Physiol** 1997; 272:L28-L37.

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

Bernstein SC, Weinberg RA. Expression of the metastatic phenotype in cells transfected with human metastatic tumor DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1985; 82:1726-30.

Besnoit C, Morel C. Note sur les lesions nervoses de la tremblante du mouton. **Revue Veter Toulouse** 1898; 23:397-400.

Blatch GL, Lassel M, Zetter BR, Kundra V. Isolation of a mouse cDNA encoding mST11 a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene** 1997; 194:277-82.

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science** 1982; 218:1309-11.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72:248-54.

Brown DR, Herms JW, Madlung A, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997a; 390:684-7.

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** 1997b; 146:104-12.

Brown DR. Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. **J Neurosci Res** 1999; 58:717-25.

Brown DR, Mohn CM. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. **Glia** 1999; 25:282-92.

Brown DR, Nicholas RS, Canevari L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. **J Neurosci Res** 2002; 67:211-24.

Brown DR. Prion protein expression modulates neuronal copper content. **J Neurochem** 2003; 87:377-85.

Brown HR, Goller NL, Rudelli RD, et al. The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. **Acta Neuropathol (Berl)** 1990; 80:1-6.

Brown P, Gibbs CJ, Jr, Rodgers-Johnson P et al. Human spongiform encephalopathy: The National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. **Ann Neurol** 1994; 35:513-29.

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. **Nature** 1997; 389:498-501.

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

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell** 1993; 73:1339-47.

Burthem J, Urban B, Pain A, Roberts DJ. The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. **Blood** 2001; 98:3733-8.

Cabral AL, Lee KS, Martins VR. Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. **J Biol Chem** 2002; 277:5675-82.

Cakarovski K, Leung JY, Restall C, et al. Novel inhibitors of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase expression in metastatic cancer cell lines. **Int J Cancer** 2004; 110:610-6.

Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets protease-activated receptors and fibrinogen in hematogenous metastasis. **Blood** 2004; 104:397-401.

Castro RMRPS. **Proteína prion celular em doenças humanas não-priónicas: aspectos moleculares e celulares**. São Paulo; 2004. [Tese de doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils pores fibrils and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. **Annu Rev Neurosci** 2003; 26:267-98.

Cervenakova L, Brown P, Goldfarb LG, et al. Infectious amyloid precursor gene sequences in primates used for experimental transmission of human spongiform encephalopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:12159-62.

Cervenakova L, Bueteftisch C, Lee HS, et al. Novel PRNP sequence variant associated with familial encephalopathy. **Am J Med Genet** 1999; 88:653-6.

Chandler RL. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. **Lancet** 1961; 1:1378-9.

Chandler RL. Experimental transmission of scrapie to voles and Chinese hamsters. **Lancet** 1971; 1:232-3.

Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. **Biotechniques** 1988; 6:632-8.

Chesebro B, Race R, Wehrly K, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. **Nature** 1985; 315:331-3.

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

Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature** 2000; 406:532-5.

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

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

Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. **Nature** 1996; 383:685-90.

Collins SJ, Lawson VA, Masters CL. Transmissible spongiform encephalopathies. **Lancet** 2004; 363:51-61.

Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev Dyn** 2000; 218:213-34.

Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:565-71.

Compere SJ, Baldacci P, Sharpe AH, Thompson T, Land H, Jaenisch R. The ras and myc oncogenes cooperate in tumor induction in many tissues when introduced into midgestation mouse embryos by retroviral vectors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1989; 86:2224-8.

Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. **Chem Biol** 1996; 3:895-904.

Creutzfeldt H. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. **Z ges Neurol Psychiatr** 1920; 57:1-19.

Cuille J, Chelle PL. Experimental transmission of trembling to the goat. **Comptes Rendus Seances l'Academie Sci** 1939; 208:1058-160.

DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner SB. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. **Neurology** 1987; 37:1271-80.

Dedhar S, Hannigan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. **Curr Opin Cell Biol** 1996; 8:657-69.

Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, et al. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. **Cancer Res** 2004; 64:719-27.

Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. **J Neuroimmunol** 2002; 128:58-68.

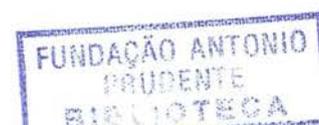
Diringer H, Oberdieck U, Malchow M, Beekes M. Transmissible spongiform encephalopathies: virally transmitted amyloidoses. **Dev Biol Stand** 1993; 80:25-9.

Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Pro-leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 163:974-9.

Du J, Pan Y, Shi Y, et al. Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. **Int J Cancer** 2005; 113:213-20.

Engvall E, Ruoslahti E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein fibronectin to collagen. **Int J Cancer** 1977; 20:1-5.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature** 2001; 411:342-8.



Felding-Habermann B, Cheresh DA. Vitronectin and its receptors. **Curr Opin Cell Biol** 1993; 5:864-8.

Felding-Habermann B, Habermann R, Saldivar E, Ruggeri ZM. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. **J Biol Chem** 1996; 271:5892-900.

Finckh U, Muller-Thomsen T, Mann U, et al. High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. **Am J Hum Genet** 2000; 66:110-7.

Finzel AH, Reininger AJ, Bode PA, Wurzinger LJ. ICAM-1 supports adhesion of human small-cell lung carcinoma to endothelial cells. **Clin Exp Metastasis** 2004; 21:185-9.

Fischer M, Rulicke T, Raeber A, et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. **EMBO J** 1996; 15:1255-64.

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

Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V. Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. **Microsc Res Tech** 2000; 50:76-88.

Freedman VH, Shin SI. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. **Cell** 1974; 3:355-9.

Freshney RI. **A manual of basic technique**. 2nd ed. New York: Alan R Liss; 1987. Culture of animal cells; p.??-??.

Friedrichsen DM, Nemhauser J, Muramitsu T, et al. Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. **Genetics** 2002; 162:1445-56.

Fuster MM, Brown JR, Wang L, Esko JD. A disaccharide precursor of sialyl Lewis X inhibits metastatic potential of tumor cells. **Cancer Res** 2003; 63:2775-81.

Gabrielsson B, Robson T, Norris D, Chung SH. Effects of divalent metal ions on the uptake of glutamate and GABA from synaptosomal fractions. **Brain Res** 1986; 384:218-23.

Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. **N Engl J Med** 1957; 257:974-8.

Gajdusek DC, Zigas V. Kuru: clinical pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system

among natives of the Eastern Highlands of New Guinea. **Am J Med** 1959; 26:442-69.

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. **Nature** 1966; 209:794-6.

Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. **Science** 1977; 197:943-60.

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr, Asher DM, et al. Precautions in medical care of and in handling materials from patients with transmissible virus dementia (Creutzfeldt-Jakob disease). **N Engl J Med** 1977; 297:1253-8.

Gasset M, Baldwin MA, Lloyd DH, et al. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:10940-4.

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

Gebb C, Hayman EG, Engvall E, Ruoslahti E. Interaction of vitronectin with collagen. **J Biol Chem** 1986; 261:16698-703.

Gehlsen KR, Sriramarao P, Furcht LT, Skubitz AP. A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin: a chain represents a binding site for the alpha 3 beta 1 integrin. **J Cell Biol** 1992; 117:449-59.

Genoud N, Behrens A, Miele G, et al. Disruption of Doppel prevents neurodegeneration in mice with extensive Prnp deletions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:4198-203.

Gherardi E, Sharpe M, Lane K, Sirulnik A, Stoker M. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) the c-met receptor and the behaviour of epithelial cells. **Symp Soc Exp Biol** 1993; 47:163-81.

Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, et al. Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:744-8.

Gibbs CJ, Jr, Gajdusek DC, Asher DM, et al. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. **Science** 1968; 161:388-9.

Glatzel M, Aguzzi A. PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. **J Gen Virol** 2000; 81:2813-21.

Goldfarb LG, Brown P, Little BW, et al. A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1993; 43:2392-4.

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

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

Grant DS, Tashiro K, Segui-Real B, Yamada Y, Martin GR, Kleinman HK. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. **Cell** 1989; 58:933-43.

Greig RG, Koestler TP, Trainer DL, et al. Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and ras-transfected NIH/3T3 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1985; 82:3698-701.

Griffith JS. Self-replication and scrapie. **Nature** 1967; 215:1043-4.

Hadlow WJ. Scrapie and kuru. **Lancet** 1959; 2:289-90.

Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:331-41.

Hajj GNM. **A proteína prion celular e seus ligantes - vitronectina STI-1 e laminina - nos mecanismos de plasticidade neuronal e neuroproteção.** São Paulo; 2004. [Tese de doutorado-Instituto de Química da USP].

Hajj GNM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Cellular prion is a vitronectin receptor supporting axonal growth: redundancy mediated by integrins. Submetido.

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

Hayman EG, Pierschbacher MD, Ohgren Y, Ruoslahti E. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1983; 80:4003-7.

Hijazi N, Shaked Y, Rosenmann H, Ben Hur T, Gabizon R. Copper binding to PrPC may inhibit prion disease propagation. **Brain Res** 2003; 993:192-200.

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. **Nature** 1997; 389:448-26.

Hirata H, Tanaka K. Artificial metastases and decrease of fibrinolysis in the nude mouse lung after hemithoracic irradiation. **Clin Exp Metastasis** 1984; 2:311-9.

Honore B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **J Biol Chem** 1992; 267:8485-91.

Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. **Lancet** 2000; 356:999-1000.

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. **Nature** 1989; 338:342-5.

Hsiao K, Dlouhy SR, Farlow MR, et al. Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. **Nat Genet** 1992; 1:68-71.

Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. **Fold Des** 1996; 1:13-9.

Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic Biol Med** 2000; 28:1379-86.

Hynes RO. Integrins: versatility modulation and signaling in cell adhesion. **Cell** 1992; 69:11-25.

Hynes RO. Integrins: bidirectional allosteric signaling machines. **Cell** 2002; 110:673-87.

Inoue I, Kitamoto T, Doh-ura K, Shii H, Goto I, Tateishi J. Japanese family with Creutzfeldt-Jakob disease with codon 200 point mutation of the prion protein gene. **Neurology** 1994; 44:299-301.

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. **Cancer Res** 1998; 58:1048-51.

Iwamoto Y, Nomizu M, Yamada Y, Ito Y, Tanaka K, Sugioka Y. Inhibition of angiogenesis tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR). **Br J Cancer** 1996; 73:589-95.

Jakob A. Über einenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). **Z ges Neurol Psychiatr** 1921; 64:147-228.

John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. **Pathol Oncol Res** 2001; 7:14-23.

Karpatkin S, Pearlstein E, Salk PL, Yogeewaran G. Role of platelets in tumor cell metastases. **Ann N Y Acad Sci** 1981; 370:101-18.

Karpatkin S, Ambrogio C, Pearlstein E. The role of tumor-induced platelet aggregation platelet adhesion and adhesive proteins in tumor metastasis. **Prog Clin Biol Res** 1988; 283:585-606.

Kim SJ, Rahbar R, Hegde RS. Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. **J Biol Chem** 2001; 276:26132-40.

Kimberlin RH. Scrapie agent: prions or virinos? **Nature** 1982; 297:107-8.

Kitamoto T, Ohta M, Doh-ura K, Hitoshi S, Terao Y, Tateishi J. Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem Biophys Res Commun** 1993; 191:709-14.

Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. Pathology of Kuru. **Lab Invest** 1959; 8:799-847.

Kocisko DA, Come JH, Priola SA, et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. **Nature** 1994; 370:471-4.

Kramer RH, Bensch KG, Wong J. Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. **Cancer Res** 1986; 46:1980-9.

Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. **Am J Pathol** 1986; 122:1-5.

Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. **Science** 1983; 222:771-8.

Lee HS, Brown P, Cervenakova L, et al. Increased susceptibility to Kuru of carriers of the PRNP 129 methionine/methionine genotype. **J Infect Dis** 2001a; 183:192-6.

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

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

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, et al. Synthetic mammalian prions. **Science** 2004; 305:673-6.

Li R, Liu D, Zanusso G, et al. The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. **Cell Immunol** 2001; 207:49-58.

Li Z, Xi X, Du X. A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin alpha IIb beta3. **J Biol Chem** 2001; 276:42226-32.

Liebkind R, Laatikainen T, Liesi P. Is the soluble KDI domain of gamma1 laminin a regeneration factor for the mammalian central nervous system? **J Neurosci Res** 2003; 73:637-43.

Liesi P, Laatikainen T, Wright JM. Biologically active sequence (KDI) mediates the neurite outgrowth function of the gamma-1 chain of laminin-1. **J Neurosci Res** 2001; 66:1047-53.

Lima FR, Muras AG, Nomizo R, Arantes CP, Brentani RR, Martins VR. Prion cellular protein and glial STI-1 and laminin modulate neuronal development submetido.

Lopes MH, Hajj GNM, Muras AG, et al. Ligand-engaged cellular prion triggers distinct signalling for neuritogenesis or neuroprotection submetido.

Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **FASEB J** 1993; 7:737-43.

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

Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. **Trends Cell Biol** 1998; 8:437-41.

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

Magalhaes AC, Silva JÁ, Lee KS, et al. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:33311-8.

Malinda KM, Nomizu M, Chung M, et al. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion tube formation and aortic sprouting. **FASEB J** 1999; 13:53-62.

Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties but does not result in neurodegeneration. **EMBO J** 2002; 21:202-10.

Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. **Science** 2003; 302:871-4.

Mange A, Milhavet O, Umlauf D, Harris D, Lehmann S. PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells. **FEBS Lett** 2002; 514:159-62.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Mol Neurobiol** 1994; 8:121-7.

Manzo G. Phylogenesis-ontogenesis-oncogenesis. **Med Hypotheses** 1989; 30:245-57.

Martinez-Morales JR, Marti E, Frade JM, Rodriguez-Tebar A. Developmentally regulated vitronectin influences cell differentiation neuron survival and process outgrowth in the developing chicken retina. **Neuroscience** 1995; 68:245-53.

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

Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. **Brain** 1981; 104:559-88.

Mastrianni JA, Iannicola C, Myers RM, DeArmond S, Prusiner SB. Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1996; 47:1305-12.

Mastrianni JA, Nixon R, Layzer R, et al. Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. **N Engl J Med** 1999; 340:1630-8.

Mazzocca A, Cappadona SS, Carloni V, et al. Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates MMP-2 in human hepatic stellate cells. **J Biol Chem** 2004.

McLean CA, Storey E, Gardner RJ, Tannenber AE, Cervenakova L, Brown P. The D178N (cis-129M) "fatal familial insomnia" mutation associated with diverse clinicopathologic phenotypes in an Australian kindred. **Neurology** 1997; 49:552-8.

Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, et al. Fatal familial insomnia a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. **N Engl J Med** 1992; 326:444-9.

Melamed R, Bar-Yosef S, Shakhar G, Shakhar K, Ben Eliyahu S. Suppression of natural killer cell activity and promotion of tumor metastasis by ketamine thiopental and halothane but not by propofol: mediating mechanisms and prophylactic measures. **Anesth Analg** 2003; 97:1331-9.

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1986; 83:2310-4.

Milis L, Morris CA, Sheehan MC, Charlesworth JA, Pussell BA. Vitronectin-mediated inhibition of complement: evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. **Clin Exp Immunol** 1993; 92:114-9.

Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. **Nat Cell Biol** 2002; 4:E83-E90.

Miura T, Hori-i A, 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 brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85:9811-5.

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. **J Mol Biol** 1999; 292:797-817.

Moussa F. **Participação da interação prion celular-laminina nos processos de adesão migração e colonização de células tumorais**. São Paulo; 2001. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Morel E, Fouquet S, Chateau D, et al. The cellular prion protein PrP^c is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. **J Biol Chem** 2004; 279:1499-505.

Narang HK. Scrapie an unconventional virus: the current views. **Proc Soc Exp Biol Med** 1987; 184:375-88.

Newbold RF, Overell RW. Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. **Nature** 1983; 304:648-51.

Nicolet CM, Craig EA. Isolation and characterization of ST11 a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 1989; 9:3638-46.

Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Res** 1999; 59:1295-300.

Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR, et al. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. **Ann Neurol** 1997; 42:138-46.

Nomizu M, Yamamura K, Kleinman HK, Yamada Y. Multimeric forms of Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) peptide enhance the inhibition of tumor growth and metastasis. **Cancer Res** 1993; 53:3459-61.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell** 1994; 79:315-28.

Oesch B, Westaway D, Walchli M, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell** 1985; 40:735-46.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. **Blood** 2005; 105:178-85.

Pammer J, Weninger W, Tschachler E. Human keratinocytes express cellular prion-related protein in vitro and during inflammatory skin diseases. **Am J Pathol** 1998; 153:1353-8.

Pampori N, Hato T, Stupack DG, et al. Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. **J Biol Chem** 1999; 274:21609-16.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:10962-6.

Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS. Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. **Biochem J** 2002; 368:81-90.

Panegyres PK, Toufexis K, Kakulas BA, et al. A new PRNP mutation (G131V) associated with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Arch Neurol** 2001; 58:1899-902.

Pattison IH, Millson G. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. **J Comp Pathol** 1961; 71:101-9.

Paulsson M, Aumailley M, Deutzmann R, Timpl R, Beck K, Engel J. Amininidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. **Eur J Biochem** 1987; 166:11-9.

Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **J Biol Chem** 1998; 273:33107-10.

Pecina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer Cell Int** 2003; 3:17.

Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. **Lancet** 2004; 364:527-9.

Peoc'h K, Manivet P, Beaudry P, et al. Identification of three novel mutations (E196K V203I E211Q) in the prion protein gene (PRNP) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. **Hum Mutat** 2000; 15:482.

Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J. Cancer and ageing in mice and men. **Br J Cancer** 1975; 32:411-26.

Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PM, et al. Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. **J Neuropathol Exp Neurol** 1998; 57:979-88.

Pilch J, Habermann R, Felding-Habermann B. Unique ability of integrin alpha(v)beta 3 to support tumor cell arrest under dynamic flow conditions. **J Biol Chem** 2002; 277:21930-8.

Pocchiari M, Salvatore M, Cutruzzola F, et al. A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. **Ann Neurol** 1993; 34:802-7.

Ponce ML, Nomizu M, Kleinman HK. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. **FASEB J** 2001; 15:1389-97.

Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, et al. PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. **J Neurochem** 2004; 88:769-81.

Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin. **Annu Rev Cell Biol** 1991; 7:275-310.

Preissner KT, Jenne D. Structure of vitronectin and its biological role in haemostasis. **Thromb Haemost** 1991; 66:123-32.

Prusiner SB, Groth DF, Cochran SP, Masiarz FR, McKinley MP, Martinez HM. Molecular properties partial purification and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. **Biochemistry** 1980; 19:4883-91.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science** 1982; 216:136-44.

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, et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. **Cell** 1983; 35:349-58.

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

Prusiner SB. Chemistry and biology of prions. **Biochemistry** 1992; 31:12277-88.

Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. **Science** 1997; 278:245-51.

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

Ramos DM, Cheng YF, Kramer RH. Role of laminin-binding integrin in the invasion of basement membrane matrices by fibrosarcoma cells. **Invasion Metastasis** 1991; 11:125-38.

Rangarajan A, Weinberg RA. Opinion: comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:952-9.

Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. **Cancer Cell** 2004; 6:171-83.

Richardson EP, Jr, Masters CL. The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. **Brain Pathol** 1995; 5:33-41.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). **Nature** 1996; 382:180-2.

Roberts MS, Woods AJ, Shaw PE, Norman JC. ERK1 associates with alpha(v)beta 3 integrin and regulates cell spreading on vitronectin. **J Biol Chem** 2003; 278:1975-85.

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

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

Samaia HB, Mari JJ, Vallada HP, Moura RP, Simpson AJ, Brentani RR. A prion-linked psychiatric disorder. **Nature** 1997; 390:241.

Sasaki T, Timpl R. Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. **FEBS Lett** 2001; 509:181-5.

Sasaki T **J C Biol** 2004;

Saulnier R, Bhardwaj B, Klassen J, et al. Fibronectin fibrils and growth factors stimulate anchorage-independent growth of a murine mammary carcinoma. **Exp Cell Res** 1996; 222:360-9.

Schluter OM, Schmitz F, Jahn R, Rosenmund C, Sudhof TC. A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. **J Neurosci** 2004; 24:6629-37.

Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. **Int J Biochem Cell Biol** 1999; 31:539-44.

Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Annu Rev Cell Dev Biol** 1995; 11:549-99.

Schwartz MA. Integrins oncogenes and anchorage independence. **J Cell Biol** 1997; 139:575-8.

Schwarz DG, Griffin CT, Schneider EA, Yee D, Magnuson T. Genetic analysis of sorting nexins 1 and 2 reveals a redundant and essential function in mice. **Mol Biol Cell** 2002; 13:3588-600.

Semb H, Christofori G. The tumor-suppressor function of E-cadherin. **Am J Hum Genet** 1998; 63:1588-93.

Shaked Y, Rosenmann H, Talmor G, Gabizon R. A C-terminal-truncated PrP isoform is present in mature sperm. **J Biol Chem** 1999; 274:32153-8.

Shang M, Koshikawa N, Schenk S, Quaranta V. The LG3 module of laminin-5 harbors a binding site for integrin alpha3beta1 that promotes cell adhesion spreading and migration. **J Biol Chem** 2001; 276:33045-53.

Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out outside-in and sideways. **Thromb Haemost** 1999; 82: 318-25.

Sheehan M, Morris CA, Pussell BA, Charlesworth JA. Complement inhibition by human vitronectin involves non-heparin binding domains. **Clin Exp Immunol** 1995; 101:136-41.

Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **J Biol Chem** 1993; 268:15922-8.

Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein PrPC in cultured cells. **J Biol Chem** 1995; 270:30221-9.

Sigurdson CJ, Miller MW. Other animal prion diseases. **Br Med Bull** 2003; 66:199-212.

Silva HC, Coletta RD, Jorge J, Bolzani G, de Almeida OP, Graner E. The effect of cyclosporin: a on the activity of matrix metalloproteinases during the healing of rat molar extraction wounds. **Arch Oral Biol** 2001; 46:875-9.

Simak J, Holada K, D'Agnillo F, Janota J, Vostal JG. Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma. **Transfusion** 2002; 42:334-42.

Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. **Cell** 1987; 49:465-75.

Sonnenberg A, Gehlsen KR, Aumailley M, Timpl R. Isolation of alpha 6 beta 1 integrins from platelets and adherent cells by affinity chromatography on mouse laminin fragment E8 and human laminin pepsin fragment. **Exp Cell Res** 1991; 197:234-44.

Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1986; 83:7358-62.

Starke R, Cramer E, Harrison P. Expression of cell-associated prion protein on normal human platelets. **Br J Haematol** 2000; 110:748-50.

Starke R, Drummond O, MacGregor I, et al. The expression of prion protein by endothelial cells: a source of the plasma form of prion protein? **Br J Haematol** 2002; 119:863-73.

Stewart DB, Nelson WJ. Identification of four distinct pools of catenins in mammalian cells and transformation-dependent changes in catenin distributions among these pools. **J Biol Chem** 1997; 272:29652-62.

Tamagnone L, Comoglio PM. Control of invasive growth by hepatocyte growth factor (HGF) and related scatter factors. **Cytokine Growth Factor Rev** 1997; 8:129-42.

Taraboletti G, Garofalo A, Belotti D, et al. Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:293-8.

Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Regional mapping of prion proteins in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:7620-4.

Tashiro K, Monji A, Yoshida I, et al. An IKLLI-containing peptide derived from the laminin alpha1 chain mediating heparin-binding cell adhesion neurite outgrowth and proliferation represents a binding site for integrin alpha3beta1 and heparan sulphate proteoglycan. **Biochem J** 1999; 340:119-26.

Thompson TC, Southgate J, Kitchener G, Land H. Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ. **Cell** 1989; 56:917-30.

Thorgeirsson UP, Turpeenniemi-Hujanen T, Williams JE, et al. NIH/3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated ras oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice. **Mol Cell Biol** 1985; 5:259-62.

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

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

Tomaselli KJ, Hall DE, Flier LA, et al. A neuronal cell line (PC12) expresses two beta 1-class integrins-alpha 1 beta 1 and alpha 3 beta 1-that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. **Neuron** 1990; 5:651-62.

Trikha M, Nakada MT. Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy. **Semin Thromb Hemost** 2002; 28:39-44.

Trikha M, Zhou Z, Timar J, et al. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in tumor growth angiogenesis and metastasis. **Cancer Res** 2002; 62:2824-33.

Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, et al. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. **FASEB J** 2000; 14:1629-40.

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.

Tysnes BB, Larsen LF, Ness GO, et al. Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. **Int J Cancer** 1996; 67:777-84.

Uemura T. The cadherin superfamily at the synapse: more members more missions. **Cell** 1998; 93:1095-8.

Vermeulen SJ, Bruyneel EA, Bracke ME, et al. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of alpha-catenin in human colon cancer cells. **Cancer Res** 1995; 55:4722-8.

Vlachova V, Zemkova H, Vyklicky L, Jr. Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. **Eur J Neurosci** 1996; 8:2257-64.

Vleminckx K, Vakaet L, Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. **Cell** 1991; 66:107-19.

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

Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. **Neurology** 2003; 61:1204-10.

Walz R, Castro RM, Landemberger MC, et al. Cortical malformations are associated with a rare polymorphism of cellular prion protein. **Neurology** 2004; 63:557-60.

Weeks BS, Nomizu M, Ramchandran RS, Yamada Y, Kleinman HK. Laminin-1 and the RKRLQVQLSIRT laminin-1 alpha1 globular domain peptide stimulate matrix metalloproteinase secretion by PC12 cells. **Exp Cell Res** 1998; 243:375-82.

Wells GA, Scott AC, Johnson CT, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Vet Rec** 1987; 121:419-20.

Wells GA, Sayers AR, Wilesmith JW. Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. **Vet Rec** 1995; 136: 211-6.

Wiksten M, Liebkind R, Laatikainen T, Liesi P. Gamma 1 laminin and its biologically active KDI-domain may guide axons in the floor plate of human embryonic spinal cord. **J Neurosci Res** 2003; 71:338-52.

Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. **Vet Rec** 1991; 128:199-203.

Wilesmith JW, Wells GA. Bovine spongiform encephalopathy. **Curr Top Microbiol Immunol** 1991; 172:21-38.

Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. **Lancet** 1996; 347:921-5.

Will RG, Zeidler M, Stewart GE, et al. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Ann Neurol** 2000; 47:575-82.

Wong BS, Pan T, Liu T, Li R, Gambetti P, Sy MS. Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 273:136-9.

Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GA, Wilesmith JW. Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. **Vet Rec** 1991; 129:233-6.

Yamada M, Itoh Y, Fujigasaki H, et al. A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Neurology** 1993; 43:2723-4.

Yamamoto A, Yano S, Shiraga M, et al. A third-generation matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor (ONO-4817) combined with docetaxel suppresses progression of lung micrometastasis of MMP-expressing tumor cells in nude mice. **Int J Cancer** 2003; 103:822-8.

Yatohgo T, Izumi M, Kashiwagi H, Hayashi M. Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. **Cell Struct Funct** 1988; 13:281-92.

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J Biochem Mol Biol** 2003; 36:128-37.

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

Zhang L, Bewick M, Lafrenie RM. Role of Raf-1 and FAK in cell density-dependent regulation of integrin-dependent activation of MAP kinase. **Carcinogenesis** 2002; 23:1251-8.

ANEXO

Em trabalhos anteriores publicados pelo grupo (MARTINS et al. 1997, ZANATA et al. 2002), foi caracterizada a interação específica entre PrPc e a co-chaperonina STI1.

A seguir, decidiu-se investigar o papel biológico dessa interação em modelos de neuritogênese e neuroproteção em neurônios hipocampais.

Inicialmente, verificou-se elevado acúmulo de ambas as proteínas em cortes de hipocampo de embriões de animais selvagens, além de alto nível de co-localização no tecido e em cultura de neurônios hipocampais dissociados.

STI1 foi capaz de promover neuritogênese de maneira dependente de PrPc, uma vez que neurônios obtidos de animais deficientes para PrPc não exibiram crescimento de neuritos. Além disso, anticorpo contra PrPc foi capaz de bloquear a neuritogênese induzida por STI1.

Mostrou-se ainda que a neuritogênese mediada pela interação PrPc-STI1 ativa a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

Como havia sido mostrado previamente para neurônios da camada pós-mitótica de explantes de retina (CHIARINI et al. 2002), STI1 exerceu papel protetor sobre neurônios hipocampais tipo selvagem - e não sobre os deficientes de PrPc, resgatando-os da morte induzida por estaurosporina, através da ativação da via de proteína quinase A (PKA) dependente de AMP cíclico.

Minha colaboração se deu nos experimentos de neuritogênese, avaliando o efeito dos diferentes tratamentos sobre a capacidade de produção de neuritos de neurônios hipocâmpais *Prnp*^{0/0} e *Prnp*^{+/+}.

Interaction of cellular prion and stress inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways

Marilene H. Lopes^{1,4}, Glaucia N. M. Hajj^{1,4}, Angelita G. Muras¹, Gabriel L. Mancini¹, Rosa M.P.S Castro¹, Karina C. B. Ribeiro², Ricardo R. Brentani^{1,2}, Rafael Linden³ and Vilma R. Martins^{1,*}.

¹Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Prof. Antônio Prudente 109/4A, 01509-010, São Paulo, Brazil. ²Centro de Tratamento e Pesquisa – Hospital do Câncer, Rua Prof. Antonio Prudente 109, 01509-010 São Paulo, Brazil. ³Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, bloco G, Cidade Universitária, 21949-900, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴These authors contributed equally to this work.

*To whom correspondence should be addressed: Dr. Vilma Regina Martins, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Ludwig Institute for Cancer Research, Rua Prof Antonio Prudente 109, 4A 01509-010, São Paulo, SP, Brazil.

Tel.: 55 11 33883200

FAX: 55 11 32077001

E-mail: vmartins@ludwig.org.br

Keywords: cellular prion protein/ MAPK/neuritogenesis /neuroprotection /PKA /STII.

Acknowledgements

We are grateful to Prof. Marco A. M. Prado for helpful discussions. We also thank Carlos F. Nascimento, Severino da Silva Ferreira and Miyuki Fukuda da Silva for technical assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 03/13189-2), CNPq, FAPERJ and PRONEX-MCT. Fellowships from FAPESP to M.H.L. and G.N.M.H., from CNPq to Gabriel L. Mancini, and from CAPES to R.M.R.P.S.C. are gratefully acknowledged.

Abstract

Understanding the physiological function of the cellular prion (PrP^c) depends on the investigation of PrP^c interacting proteins. STI1, stress inducible protein 1, is a specific PrP^c ligand that promotes neuroprotection of retinal neurons through cAMP-dependent protein kinase A (PKA). Herein, we examined the signaling pathways and functional consequences of the PrP^c interaction with STI1 in hippocampal neurons. Both PrP^c and STI1 are abundantly expressed and highly co-localized in the hippocampus *in situ*, indicating that they can interact *in vivo*. STI1 elicited neuritogenesis in wild-type neurons, but not in PrP^c-null cells. This effect was abolished by antibodies against either PrP^c or STI1 and was dependent on the STI1 domain that binds PrP^c. These proteins' binding induced the phosphorylation/activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase, which was essential for STI1-promoted neuritogenesis. STI1, but not its counterpart lacking the PrP^c binding site, prevented cell death via PKA activation. These results demonstrate that two parallel effects of the PrP^c-STI1 interaction, neuritogenesis and neuroprotection, are mediated by distinct signaling pathways.

Introduction

Cellular prion protein (PrP^c) is an ubiquitous, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein, the physiological functions of which are still under discussion. Several biological roles for PrP^c have been proposed, such as protection against oxidative insults, neuronal adhesion, cell differentiation and survival (Brown and Sassoon, 2002; Martins et al., 2002a). Components of various signal transduction pathways, including the Src-related family member p59^{Fyn}, PI3 kinase/Akt, PKA (cAMP-dependent protein kinase) and mitogen activated protein kinases (MAPK) have been suggested to mediate roles of PrP^c in neuronal survival and neurite outgrowth (Santuccione et al., 2005; Chiarini et al., 2002; Chen et al., 2003b).

PrP^c is constitutively expressed in neurons, and is abundant in regions such as the olfactory bulb, hippocampus and synaptic neuropil in close spatio-temporal association with synapse formation. The localization of PrP^c in elongating axons suggests a role in

axon growth (Sales et al., 1998;Sales et al., 2002). Interestingly, interaction of PrP^c with the extracellular matrix protein laminin has been shown to promote neuritogenesis and maintenance of neurites (Graner et al., 2000a;Graner et al., 2000b).

Furthermore, strong evidence for a neuroprotective PrP^c function derived from our description of a putative PrP^c p66 ligand (Martins et al., 1997), which was later identified as the Stress Inducible Protein 1, STI1 (Zanata et al., 2002;Chiarini et al., 2002). STI1 was described in *Saccharomyces cerevisiae*, in which it was shown to mediate the heat shock response of Hsp70 genes (Nicolet and Craig, 1989). Murine STI1 has 97% amino acid identity with its human homologous designated Hop [heat shock protein 70 (Hsp70)/heat shock protein 90 (Hsp90)-organizing protein]. STI1, as well as Hop, interacts with Hsp70 and Hsp90 at its N- and C-termini (van der et al., 2000;Carrigan et al., 2004). This interaction facilitates transfer of substrates from Hsp70 to Hsp90 and is important for proper protein folding and maturation (Hernandez et al., 2002).

Interaction of PrP^c with either STI1 or a peptide mimicking the PrP^c-binding domain of STI1 prevented programmed cell death of undifferentiated post-mitotic retinal cells (Chiarini *et al.*, 2002;Zanata *et al.*, 2002). Engagement of PrP^c increased intracellular cAMP, and activated the MAPK pathway in retinal tissue. However, the neuroprotective effect required the activity of PKA, rather than MAP kinase (Chiarini *et al.*, 2002).

We have proposed that PrP^c is part of a multi-protein complex that modulates various cellular functions, depending on both protein combination and cell type (Martins *et al.*, 2002). Hence, it is important to dissect the cell signaling and biological significance of the association of PrP^c with each one of its partners and in different cell types. We have, therefore, examined the functional responses and signaling pathways induced by the interaction of STI1 with PrP^c in hippocampal neurons, particularly the roles of the cAMP/PKA and MAPK pathways. Our data indicate that PrP^c and STI1 co-localize in the hippocampus, and that the interaction of STI1 with PrP^c has pronounced effects on both neuritogenesis and survival in hippocampal neurons. The neuritogenesis was found to be dependent only on MAPK activity, while cAMP-dependent PKA mediates neuroprotection.

Materials and methods

Material

Mouse recombinant STI1 (His₆-STI1) and PrP^c (His₆-PrP^c) were purified as previously described (Zanata *et al.*, 2002). Peptides corresponding to mouse STI1 amino acid sequences pepSTI1₂₃₀₋₂₄₅ (aa 230-ELGNDAYKKKDFDKAL-245) and pepSTI1₄₂₂₋₄₃₇ (aa 422-QLEPTFIKGYTRKAAA-437) were chemically synthesized by Neosystem. Polyclonal antibodies anti-STI1 (Zanata *et al.*, 2002), and anti-pepSTI1₂₃₀₋₂₄₅ raised in rabbits were obtained from Bethyl, while anti-PrP^c was produced in PrP^c-null mice (Chiarini *et al.*, 2002). The monoclonal antibody 6H4 against amino acids 144-152 of human PrP^c was purchased from Prionics. Chemical inhibitors for different signaling proteins were used: MEK inhibitor 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadiene (U0126 or U0), PKA inhibitor (KT5720 or Kt) and PKC inhibitors bisindolylmaleimide (Bim) and Chelerethrin Chloride (Chel). The inhibitors were from Calbiochem, except for U0126, which was from Promega.

Immunohistochemistry

Embryonic day (E) 17 mouse embryos were fixed with formalin, and embedded in paraffin. Sections (3-4µm) were deparaffinized, rehydrated and subjected to epitope retrieval by microwave heating in 10mM citrate buffer (pH 6.4). Additional treatment was made with 50mM glycine, 0.02g/l Triton X-100, 0.5 g/l nonfat dry milk and 1.5g/l non-immune goat serum (Martins *et al.*, 1999). Endogenous peroxidase was blocked with 0.3g/l hydrogen peroxide. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies, anti-PrP^c (1:1,000) (Chiarini *et al.*, 2002) or anti-STI1 (1:250) (Zanata *et al.*, 2002) diluted in PBS plus 0.5g/l nonfat dry milk and 1.5g/l normal goat serum, followed by incubation for 60 minutes at 37°C with Dako EnVision Labeled Polymer peroxidase. Color was developed using DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride-Sigma) and counterstained with haematoxylin. Sections were visualized in an Olympus IMT2-NIC microscope.

Immunofluorescence

Tissue: Brains from E17 wild-type and PrP^c-null mice were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. Cryostat sections (3µm) were fixed in ice-cold acetone for 30 minutes and air-dried. Then, they were re-hydrated and blocked with TBS (20mM Tris, 150mM NaCl) containing 0.1% Triton-X100, 10% normal goat serum and 50µg/ml anti-mouse IgG at room temperature for 1 hour. Brain sections were then incubated at room temperature for 16 hours with anti-PrP^c mouse serum (1:250) (Chiarini *et al.*, 2002) and anti-STI1 rabbit serum (1:100) (Zanata *et al.*, 2002) in TBS 0.1% Triton-X100 with 1% normal goat serum. After washing, anti-mouse Alexa-568 (Molecular Probes) 1:3,000 and anti-rabbit FITC (Pharmingen) 1:1,000 were added to the slices and incubated in the same buffer for 1 hour at room temperature.

Cultured cells: Hippocampal neurons (1x10⁵ cells) were plated on glass coverslips coated with poly-L-lysine, washed with PBS and fixed for 20 min. at room temperature with 4% *p*-formaldehyde, 0.12M sucrose in PBS. For permeabilization, the cells were incubated with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 minutes at room temperature. After rinsing with PBS, cultured cells were treated for 1h at room temperature with blocking solution [5% BSA (Bovine Serum Albumin-Sigma) in PBS]. For PrP^c and STI1 staining, cells were incubated at room temperature for 1h with anti-PrP^c (1:100) and anti-STI1 (1:100) antibodies (Chiarini *et al.*, 2002) diluted in 1% BSA in PBS. The reaction proceeded with incubation with secondary antibodies [anti-rabbit Cy3 1:3,000 (Amersham) or anti-mouse Alexa-488 (Molecular Probes) 1:500], followed by permeabilization for DAPI staining. After additional washes, the coverslips were mounted on slides using Fluoromount (Southern Biotech). Immunolabeled cells were imaged with a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning confocal system running the software Laser Sharp 3.0, coupled to a Nikon microscope (TE2000-U). Argon (488nm) and Green HeNe (543nm) lasers were used to excite the fluorophores. Image processing was done with Photoshop (Adobe Systems).

Immunoblotting analysis

Purified proteins (STI1 and STI1Δ230-245) or protein extracts prepared from wild-type (*Prnp*^{+/+}) and PrP^c-null mice (*Prnp*^{0/0}) hippocampal cells (Bueler *et al.*, 1992)

in Laemmli buffer were resolved in 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with polyclonal antibody anti-STII (1:10,000) or anti-pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ (1:5,000) (Zanata *et al.*, 2002). Protein loading control was performed with a polyclonal antibody to actin (1:200, Sigma). Rabbit non-immune purified IgG was used as immunoblotting negative control.

Construction of STII Δ 230-245

Recombinant PCR technique (Ausubel *et al.*, 1993) was used to delete the PrP^c binding site of STII. We amplified cDNA fragments employing pTRC-His A STII (Zanata *et al.*, 2002) with internal primers 5' AAAGAGAAGAAGCATTATGAC 3' and 5'GTCATAATGCTTCTTCTCTTT 3' and external primers 5' CCGCTCGAGGAGCAG GTGAATGAGCTAAAGGA 3' and 5' CGGGGTACCTCACCGAATTGCGATGAG ACCC 3'. The PCR fragments were cloned between *XhoI* and *KpnI* restriction sites in the same vector. Sequencing analysis was done to check for the deletion. The expression and purification of this protein followed the same protocol as previously described (Zanata *et al.*, 2002).

Overlay assay

The indicated amounts of recombinant His₆-PrP^c and BSA were adsorbed onto nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with 5% nonfat milk in TBST (TBS 0.05% Tween-20) for 1 hour at room temperature and washed, followed by incubation with either wild-type His₆-STII (2 μ g) or mutant His₆-STII Δ 230-245 (2 μ g) for 16 hours at 4°C. After extensive washing with TBST, membranes were incubated with polyclonal antibody anti-STII (1:10,000) (Zanata *et al.*, 2002) for 2 hours at room temperature, followed by a second incubation with peroxidase-coupled anti-rabbit IgG. The reaction was developed using enhanced chemiluminescence (ECL–Amersham Biosciences).

Neuritogenesis assays

Primary hippocampal cultures were obtained from E17 brains of either wild-type (*Prnp*^{+/+} - a strain generated by crossing F1 descendants from 129/SV and C57BL/6J mating), or PrP^c-null mice (*Prnp*^{0/0}) (Bueler *et al.*, 1992). The hippocampal structure was

aseptically dissected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen) and treated with trypsin (0.06%) in HBSS for 20 min at 37°C. The protease was inactivated with 10% FCS (fetal calf serum) in Neurobasal medium (Invitrogen) for 5 min. After three washes with HBSS, cells were mechanically dissociated in Neurobasal medium containing B-27 supplement (Invitrogen), Glutamine (2mM) (Invitrogen), penicillin (100 IU) and streptomycin (100µg/ml) (Invitrogen). The cells (4×10^4 cells) were plated onto coverslips (13mm) coated with 5µg/ml of poly-L-lysine (Sigma) and treated with recombinant His₆-STII, His₆-STII Δ 230-245; peptides pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ and pepSTII₄₂₂₋₄₃₇; anti-PrP^c (6H4) (6µg/ml) or anti-pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ (1:200) for 16 h at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. For analysis of signal transduction mechanisms, cells were pre-incubated for 1h with specific inhibitors U0126, KT5720, Bim and Chel dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) before stimulation of neuritogenesis by STII for 16h. Control cultures received the same concentration of DMSO (0.005%). The cells were fixed with 4% p-formaldehyde in 0.12M sucrose in PBS for 20 min. at room temperature, washed 3 times with PBS and stained with haematoxylin.

Morphometric analyses were done using Image J software (National Institute of Health) and Neuron J plug in. The parameters measured were: percentage of cells with neurites (cells with neurites of any size / total number of cells), number of neurites/cell (total number of neurites/number of cells with neurites), mean length of neurites/cell (total length of neurites/number of cells with neurites) and percentage of cells with neurites longer than 12µm, which represents 3 or more times the average cell body (number of cells with neurites longer than 12µm / total number of cells). Approximately, a total of 300 cells per sample were analyzed. Data are presented as mean \pm standard deviation from at least three independent experiments.

MAPK phosphorylation and activity assays

Phosphorylation assays were done using the PhosphoPlus p44-42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) antibody kit (Cell Signaling) according to the manufacturer's instructions. Briefly, primary hippocampal cell cultures (10^6 cells) from either *Prnp*^{+/+} or *Prnp*^{0/0} were plated on dishes pre-treated with poly-L-lysine, and stimulated with STII (4.9×10^{-7} M) for different incubation periods, rinsed once with ice-cold PBS and lysed in

Laemmli buffer. For assaying MAPK phosphorylation, cell extracts were subject to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-phospho-MAPK and anti-total-MAPK antibodies (Cell Signaling). The bands obtained after X-ray film exposure to the membranes, were analyzed by densitometric scanning and quantified using the Scion Image software. Values represent the ratio between phospho-MAPK (p42 + p44) and total MAPK (p42 + p44) for each sample. Untreated *Prnp*^{+/+} or *Prnp*^{0/0} values were set as 1.0 and the others are relative to it. The p44/42 MAP Kinase Assay kit (Cell Signaling) was used for estimating the activity of MAPK in primary hippocampal cultures treated with STI1 (4.9x10⁻⁷M). Cells were disrupted in lysis buffer, centrifuged for 10 min at 4°C and the supernatant was transferred to a fresh tube. Active MAPK was immunoprecipitated from 80µg of total protein in each sample using an immobilized phospho-p44/42 MAP kinase monoclonal antibody (Cell Signaling). MAPK activity was evaluated by incubation with Elk-1 substrate, followed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phospho Elk-1 (Cell Signaling).

Cell death assay

Primary hippocampal cultures (4x10⁴ cells) from wild-type mice were grown onto poly-L-lysine coated coverslips, and pre-incubated with His₆-STI1 (7x10⁻⁶ M) or control buffer (TBS) for 2 h, followed by staurosporine for 16h. Cell cultures treated with signaling enzymes inhibitors received KT5720, U0126, Bim or Chel 1h before incubation with STI1. The cell cultures were fixed with 4% paraformaldehyde plus 0.12M sucrose in phosphate buffer saline pH 7.4 for 20 min and stained with propidium iodide (Sigma) in PBS-0.1% Triton for 20 min. Cell death induced by staurosporine (Favata *et al.*, 1998) was detected as condensed and pyknotic profiles. At least three independent experiments were done and 3 microscopic fields were counted in each group.

Statistical analysis

The results represent the mean ± standard deviation of at least three independent experiments. Two-way ANOVA with a Tukey HSD *post hoc* test was used for neuritogenesis, cell death assays and experiments with inhibitors. The phospho-MAPK statistical analyses were done using single mean Student's *t* test.

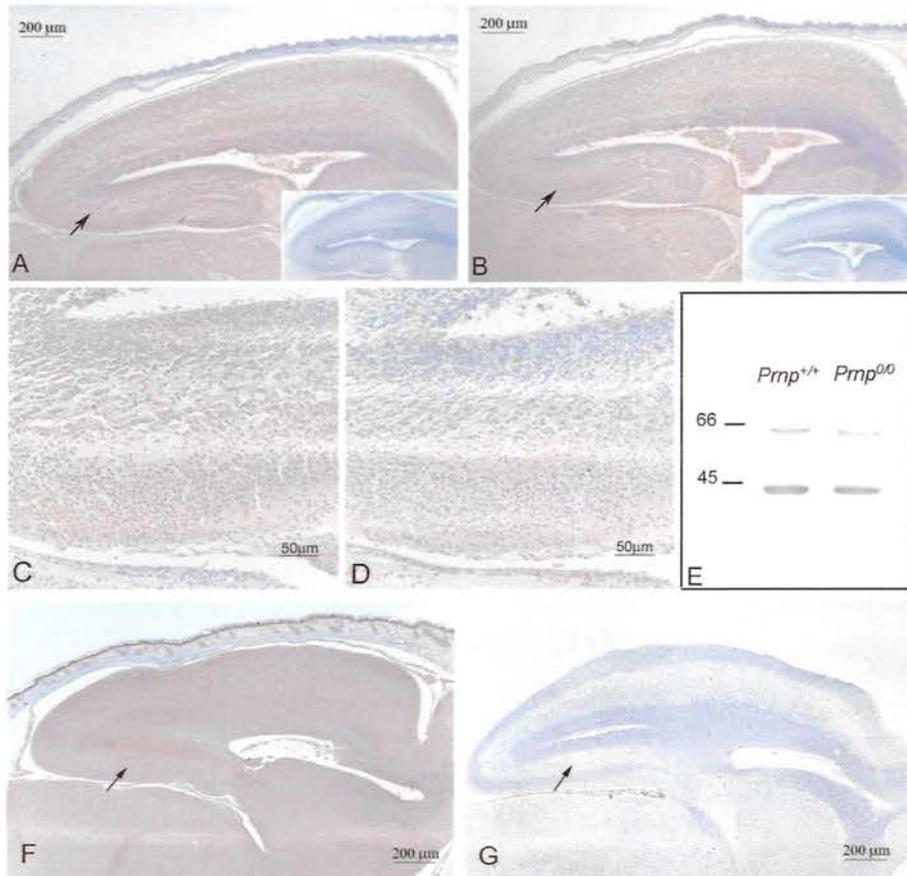


Figure 1: **STII and PrP^c are expressed in the hippocampus.** Histological brain sections from wild-type (*Prnp*^{+/+}, A-D) and PrP^c null (*Prnp*^{0/0}, F and G) mouse embryos (E17) were immunostained for STII (A, C and F) and PrP^c (B, D and G) and counterstained with haematoxylin. Higher magnifications of the indicated areas (arrows) from panels A and B are shown in C and D respectively. Irrelevant antibody controls lack specific signals (inserts panels A and B). Hippocampus is indicated by arrows in panels F and G. Panel E, brain homogenates from wild-type (*Prnp*^{+/+}) and PrP^c null (*Prnp*^{0/0}) mice were immunoblotted using antibodies against STII (66kDa) and actin (45 kDa).

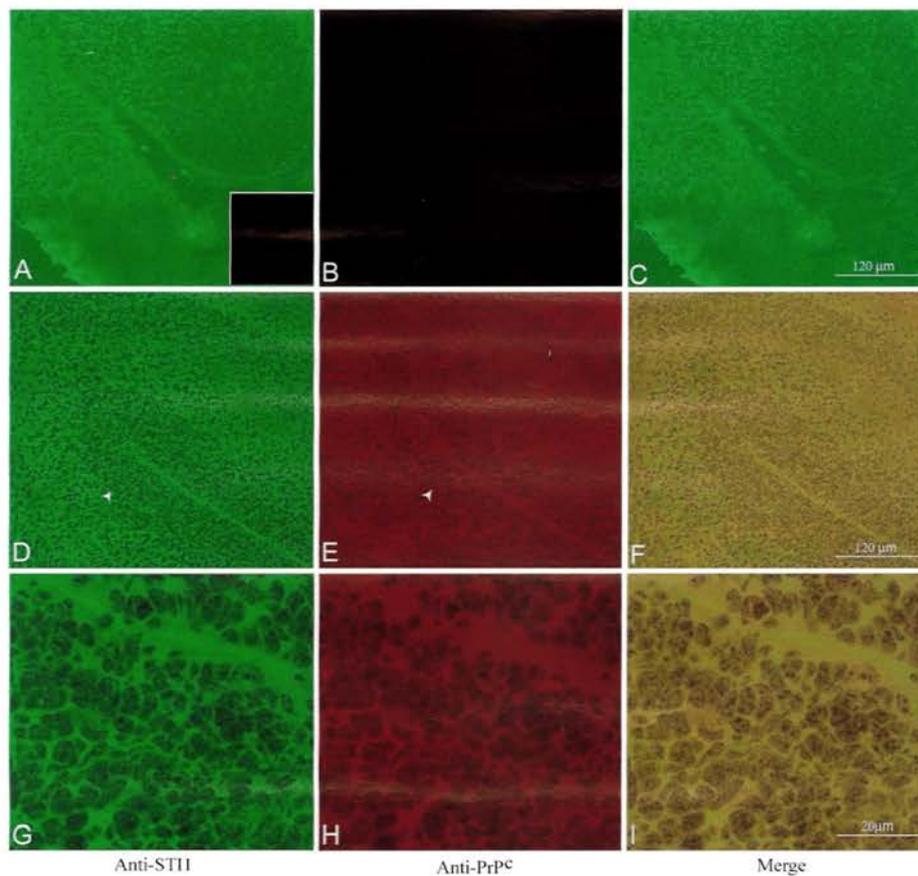


Figure 2: Colocalization of STII and PrP^c in hippocampus. Histological brain sections of *Prnp*^{0/0} (A-C) and *Prnp*^{+/+} (D-I) mouse embryos (E17) were immunostained for STII (A, D and G) and PrP^c (B, E and H). The hippocampal structure pointed (arrowhead in panels D and E) is shown at higher magnification (G and H). Right panels (C, F and I) are merged images of immunostaining for STII (green) and PrP^c (red). There is an extensive colocalization (yellow) of the two proteins in the developing hippocampus. Pre-immune rabbit serum displayed no specific staining (insert panel A).

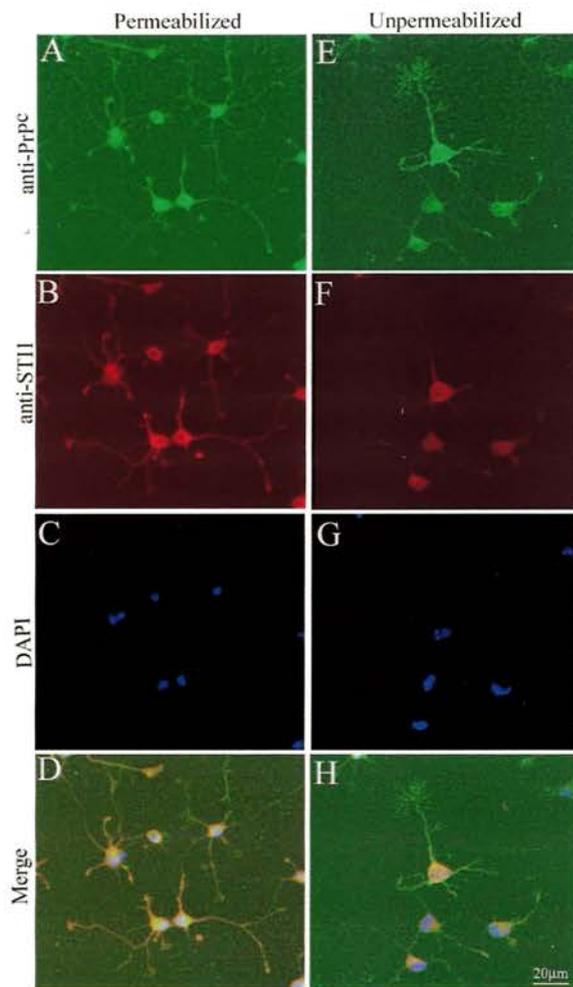


Figure 3: **STII and PrP^c colocalize in cultured hippocampal neurons.** Cultured, permeabilized or unpermeabilized hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} mice were immunostained for PrP^c (A and E) and STII (B and F). Cell nuclei were labeled with DAPI (panels C and G). Confocal images of permeabilized cells show extensive colocalization of both proteins in the cell body, perinuclear region and neurites (D). In unpermeabilized cell, colocalization was observed at the surface of the cell soma (H).

STII promotes neuritogenesis

Based on the STII and PrP^c colocalization in hippocampal neurons and in previous description of PrP^c-laminin induced neuritogenesis, we investigated whether STII may promote neuritogenesis mediated by PrP^c. Primary hippocampal cultures from *Prnp*^{+/+} or *Prnp*^{0/0} mouse embryos (E17) were treated either with recombinant wild-type His₆-STII or pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ (STII peptide which corresponds to the PrP^c binding site). Treatments led to a substantial increase in the proportion of wild-type cells with neurites, as assessed either through the counting of processes of all sizes (Figure 3A) or processes longer than 12μm (Figure 4B). On the other hand, no differences were seen in the number of neurites/cell (Figure 4C) or in the mean length of neurites/cell (Figure 4C). These results indicate that STII enhanced only the neuritogenic response of hippocampal cells (% of responsive cells) and did not alter the final neurite characteristics (number or length). Conversely, *Prnp*^{0/0} neurons did not extend neurites in response to STII or pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ (Figure 4 A and D).

To characterize whether neuritogenesis promoted by STII depends on its specific interaction with PrP^c, we constructed an STII deletion mutant lacking residues 230-245 (His₆-STIIΔ230-245), a domain previously characterized as containing the PrP^c binding site (Zanata *et al.*, 2002). Figure 5A shows that His₆-STIIΔ230-245 has the expected molecular weight and is recognized by the anti-STII serum (lane 1), but not by an antibody that recognizes the deleted residues (anti-pepSTII₂₃₀₋₂₄₅, lane 3). On the other hand, wild-type His₆-STII is recognized by both antibodies (lanes 2 and 4). An overlay experiment was performed to test the binding capacities of the wild-type and mutant His₆-STII to PrP^c. His₆-PrP^c and BSA were immobilized onto a nitrocellulose membrane, incubated with wild-type His₆-STII (lane 6) or His₆-STIIΔ230-245 (lane 5) and immunoreacted with the anti-STII antibody. This experiment confirmed that wild-type STII binds PrP^c (lane 6), while mutant His₆-STIIΔ230-245 does not (lane 5). The graph in figure 5B shows that His₆-STIIΔ230-245 was unable to promote neuritogenesis in wild-type neurons, thus demonstrating that the PrP^c-binding domain on STII is necessary to induce the neuritogenic response.

We further tested the effect of blocking PrP^c-STII interaction in wild-type cells.

Hippocampal neurons treated with His₆-STI1 in the presence of antibodies against PrP^c or pepSTI1₂₃₀₋₂₄₅, presented no neurotogenic response, when compared to His₆-STI1 treated cells (control). Neither irrelevant control mouse IgG nor pre-immune rabbit serum had any effect (Figure 5C). Therefore, blocking neuronal PrP^c with a specific antibody reproduces the results observed in *Prnp*^{0/0} neurons. This indicates that the data obtained with PrP^c-null neurons were not due to any random events, rather by the absence of PrP^c.

Taken together, the results demonstrate that specific STI1-PrP^c interaction promoted neuritogenesis, and that the PrP^c binding domain of STI1 is both necessary and sufficient for inducing this effect.

MAP kinase activity is required for neuritogenesis induced by STI1-PrP^c interaction

We previously showed that engagement of PrP^c with a peptide mimicking the PrP^c binding site of the STI1 molecule produced the activation of both cAMP/PKA and MAPK pathways (Chiarini *et al.*, 2002). However, the protection against programmed cell death of retinal neurons mediated by engagement of PrP^c, required activity of PKA rather than MAP kinase. Interestingly, MAPKs have been implicated in neuritogenesis stimulated by cell adhesion molecules and neurotrophic factors (Doherty *et al.*, 2000; Huang and Reichardt, 2001).

To test whether MAPK activation is required for the STI1-PrP^c neurotogenic response, we cultured hippocampal neurons in the presence of U0126, a specific inhibitor of the MAPK kinases MEK-1 and MEK-2 which blocks ERK1/2 phosphorylation (Favata *et al.*, 1998). In addition, we tested a set of signaling transduction molecules specific inhibitors.

The MAPK inhibitor significantly decreased the percentage of cells with neurites (Figure 6A) and the percentage of cells with neurites longer than 12µm (Figure 6B), while the mean number of neurites/cell (Figure 6C) and the mean neurite length/cell (Figure 6C) remained unaltered. Cresyl violet staining indicated no significant cell death among cells treated with U0126 (data not shown). Conversely, neither KT5720 (Kt), a cell-permeable selective inhibitor of PKA, nor specific PKC inhibitors chelerythrin chloride (Chel) and bisindolylmaleimide (Bim) (Audesirk *et al.*, 1997) had any effect

upon neuritogenesis induced by His₆-STI1 (Figures 6 A and B). Furthermore, these drugs did not alter the number of neurites or their length (Figures 6 C and D).

To verify whether STI1-PrP^c interaction induces a MAPK cascade in hippocampal neurons, immunoblotting assays were done to determine the phosphorylation/activation status (Figure 7A, pMAPK). Immunoblotting against total MAPK (Figure 7A, MAPK) was also done to check for protein loading amounts. The relative levels of MAPK phosphorylation were quantified in *Prnp*^{+/+} (Figure 7B) and *Prnp*^{0/0} (Figure 7C). *Prnp*^{+/+} neurons treated with His₆-STI1 presented a rapid increase in the phosphorylation status of both p42 and p44 forms of MAPK, while no effect was observed in *Prnp*^{0/0} cells.

The activity of p42/p44 MAPK was determined by assessing its ability to phosphorylate a specific recombinant substrate, Elk1, which was then visualized by immunoblotting (Figure 7A, pELK-1). His₆-STI1 also induced p42/p44 MAPK activation in *Prnp*^{+/+} neurons but not in *Prnp*^{0/0} ones (Figures 7A). A higher basal phosphorylation and activity levels of MAPK was found in *Prnp*^{0/0} when compared to wild-type cells (Figure 7A), confirming our previous data in newborn mouse retina (Chiarini *et al.*, 2002), as well as those of other authors in adult brain and cerebellum (Brown *et al.*, 2002).

These results show that the neuritogenesis induced by interaction of PrP^c and STI1 depends on MAPK, rather than PKA or PKC.

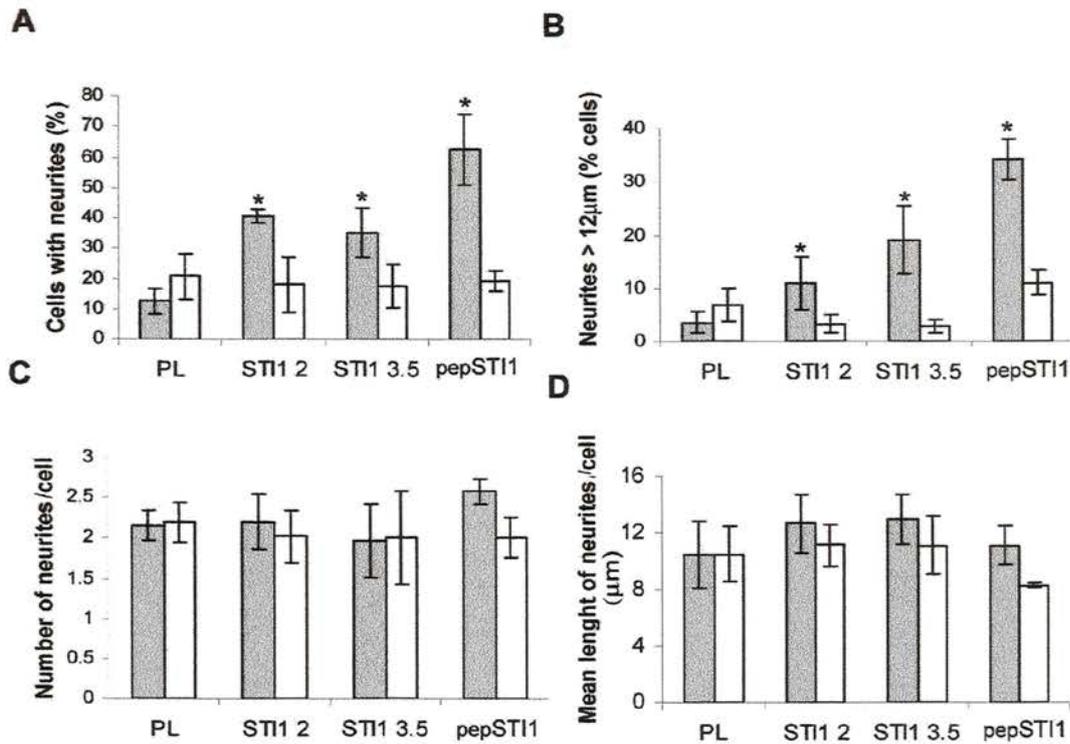


Figure 4: STI1 and its PrP^c-binding domain induce PrP^c-dependent neuritogenesis.

A, Cultured hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} (grey bars) or *Prnp*^{0/0} (white bars) were grown on poly-L-lysine (PL) and incubated with His₆-STI1 at 2x10⁻⁷M (STI1 2) or 3.5x10⁻⁷M (STI1 3.5), or with 1.6x10⁻⁵M of STI1 peptide₂₃₀₋₂₄₅ (pepSTI1). Neurons were fixed, stained and the neurites were quantified. Values represent the means of at least three independent experiments, vertical bars represent standard deviation, * *p* < 0.005 (Anova and Tukey *post hoc* test) vs. PL. Panel *A* represents the percentage of cells with neurites of any size and panel *B* the percentage of cells with neurites longer than 12 μm. Panel *C* represents the number of neurites/cell and panel *D* shows the mean length of neurites/cell.

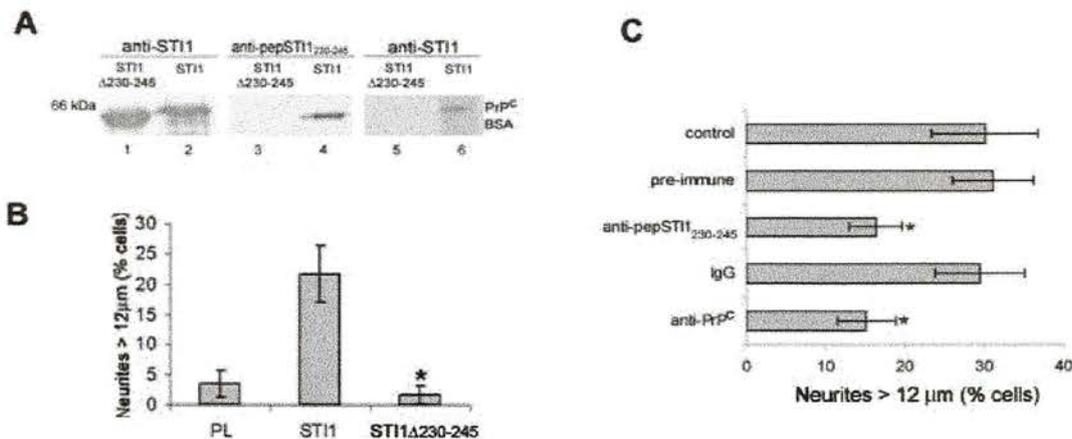


Figure 5: STII-induced neuritogenesis depends on PrP^c-binding site and PrP^c expression. *A*, Wild-type His₆-STII (lanes 2 and 4) and His₆-STIIΔ230-245 (lanes 1 and 3) were immunoblotted with anti-STII (lanes 1 and 2) and anti-pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ antibodies (lanes 3 and 4). Lanes 5 and 6 show the overlay assay, where BSA (2 μg) and His₆-PrP^c (1 μg) were adsorbed onto a membrane, which was incubated with His₆-STII (lane 6) or His₆-STIIΔ230-245 (lane 5) followed by immunoblotting with anti-STII antibody. *B*, The graph shows neuritogenesis of primary hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} embryos treated with either His₆-STII or His₆-STIIΔ230-245. * statistical significance when compared to His₆-STII treated neurons: $p < 0.005$ (Anova and Tukey *post hoc* test). *C*, hippocampal neurons were incubated with 2×10^{-7} M His₆-STII (control) followed by treatment with anti-pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ serum or its pre-immune control. Neurons in the presence of His₆-STII were also treated with anti-PrP^c monoclonal antibody (6H4) or control mouse IgG. Values represent the mean of at least three independent experiments, horizontal bars represent standard deviation. * $p < 0.005$ (Anova and Tukey *post hoc* test) vs. control.

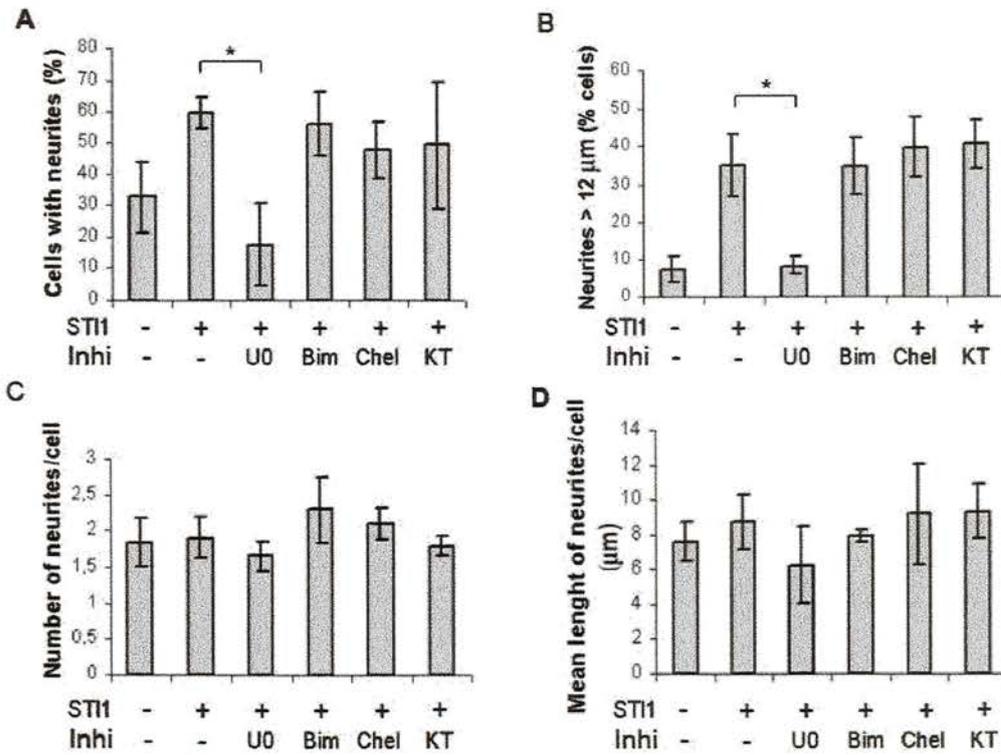


Figure 6: MAPK pathway is required for neuritogenesis induced by STI1.

Prnp^{+/+} hippocampal neurons were plated on poly-L-lysine, pre-treated for 1h with inhibitors 2.5×10^{-5} M U0; 5×10^{-7} M Bim; 10^{-7} M Chel or 6×10^{-8} M Kt and incubated with STI1 (3.5×10^{-7} M) for 16 h. Cells were fixed, stained with haematoxylin and neurites were quantified. Values represent the mean and standard deviation (vertical bars) of at least three independent experiments. Panel A represents the percentage of cells with neurites of any size and panel B the percentage of cells with neurites longer than 12 μ m. Panel C represents the number of neurites/cell and panel D shows the mean length of neurites/cell. * $p < 0.005$ (Anova and Tukey *post hoc* test) vs. control.

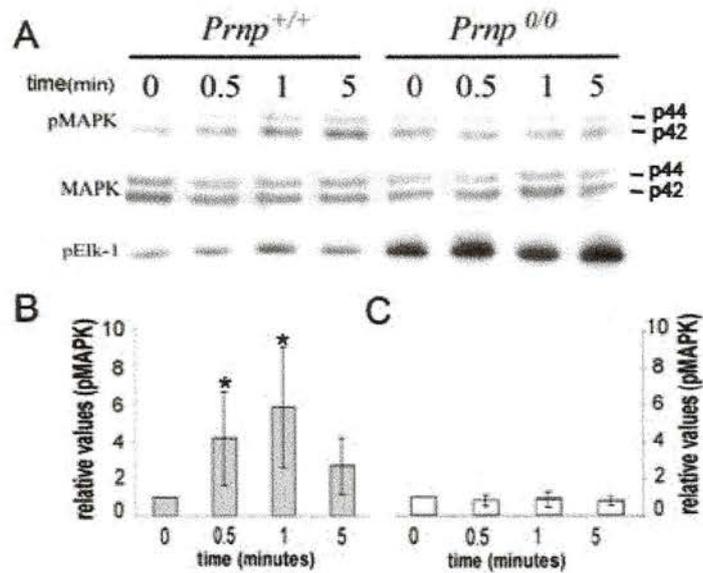


Figure 7: STI1 activates MAPK pathway.

A, Hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} mice were grown on poly-L-lysine and treated with STI1 (4.9×10^{-7} M) for 0.5, 1 or 5 minutes. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-phospho-MAPK antibody (pMAPK). After stripping, the blots were re-probed with anti-total MAPK (MAPK). MAPK activity was measured by phosphor-MAPK immunoprecipitation, incubation with Elk-1 substrate, SDS-PAGE and immunoblotting using anti-phospho-Elk-1 (pElk-1). *B* (*Prnp*^{+/+}) and *C* (*Prnp*^{0/0}), immunoblots performed for MAPK phosphorylation and total MAPK were quantified by densitometry. Graphics represent the ratio between phospho-MAPK and total MAPK. *, $p < 0.05$ (Single mean Student's *t* test, vs. respective untreated cells).

STII promotes neuroprotection in hippocampal neurons through cAMP-dependent protein kinase A

We then tested whether STII induces neuroprotective responses in hippocampal neurons similar to retinal explants (Chiarini *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2002). Primary hippocampal cultures from mouse embryos (E17) were treated with staurosporine (*Streptomyces staurospores*), a non-selective protein kinase inhibitor (Ruegg and Burgess, 1989), that is often used as a general inducer of apoptosis (Nicotera and Orrenius, 1998).

Hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} mice were sensitive to cell death induced by staurosporine in a dose dependent-manner (Figure 8A). Treatment with His₆-STII rescued *Prnp*^{+/+} neurons, depending on the presence of the PrP^c binding site of STII, since the mutated His₆-STII Δ ₂₃₀₋₂₄₅ had no effect on cell survival (Figure 8B). The His₆-STII concentration necessary to rescue hippocampal neurons from cell death (7×10^{-6} M) was similar to that previously described in retinal neurons (Chiarini *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2002).

We have previously found that His₆-STII, pepSTII₂₃₀₋₂₄₅ and another PrP^c-engaging peptide prevented programmed cell death of undifferentiated post-mitotic retinal cells induced by anisomycin, through activation of PKA (Chiarini *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2002). To test whether the PKA pathway is also involved in STII-induced neuroprotection of hippocampal neurons, we tested the effects of specific signaling inhibitors. The neuroprotective effect of STII was abrogated by the PKA inhibitor (Kt), whereas PKC (Bim or Chel) and MAPK (U0) inhibitors had no effect (Figure 8B). These results suggest the involvement of PKA pathway in neuroprotection induced by STII in hippocampal neurons, similar to our previously described results in retinal tissue (Chiarini *et al.*, 2002).

Therefore, PKA activity is required for neuroprotection stimulated by the interaction of STII with PrP^c, while neither MAPK nor PKC are related to this effect.

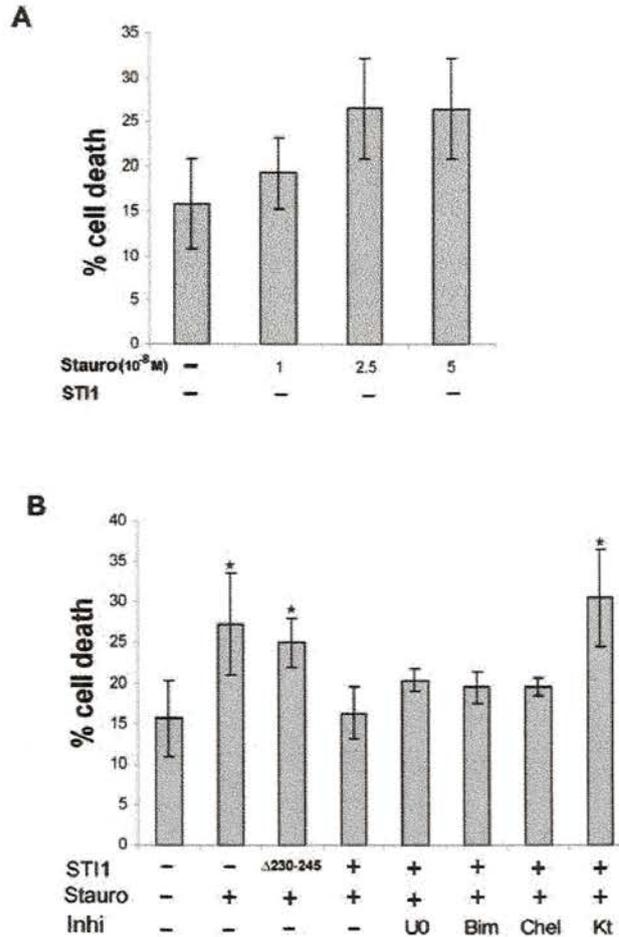


Figure 8: STI1 rescues hippocampal neurons from staurosporine-induced apoptosis through PKA signaling pathway. *A*, hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} mice were plated on poly-L-lysine, either pre-treated or not with STI1 (7×10^{-6} M) for 1h, and incubated with increasing concentrations of staurosporine (1 , 2.5 and 5×10^{-8} M) for 16h. *, $p < 0.05$ vs. staurosporine treatment. *B*, hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} mice were plated on poly-L-lysine, either pre-treated or not for 1h with 7×10^{-6} M of His₆-STI1 or His₆-STI1 Δ 230-245. Cells were then treated with the inhibitors (Inhi), 5×10^{-5} M U0; 5×10^{-7} M Bim; 10^{-7} M Chel or 6×10^{-8} M Kt for 1h. Cell death was induced by treatment with 2.5×10^{-8} M staurosporine (Stauro) for an additional 16h. The cells were fixed, stained with propidium iodide, and the percentage of pyknotic profiles, indicating cell death, was estimated. Values represent the mean and standard deviation (vertical bars) of at least three independent experiments. * $p < 0.03$ (Anova and Tukey *post hoc* test) vs. control.

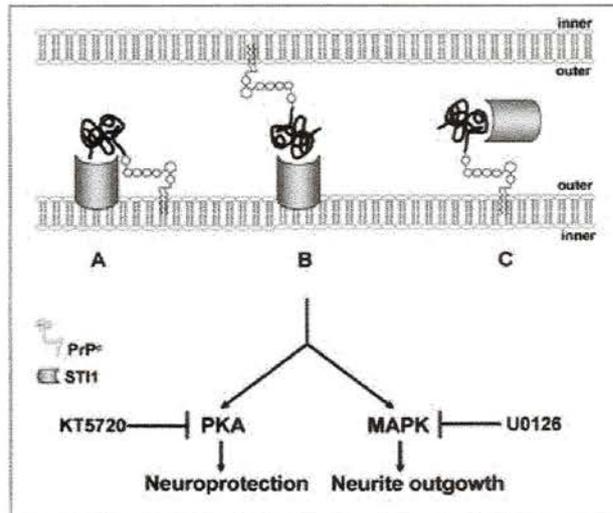


Figure 9: **Interaction of STII with PrP^c induces both neuritogenesis and neuroprotection through distinct signaling pathways.** The cAMP-PKA dependent pathway is implicated in neuroprotection, demonstrated in both retinal (Chiarini *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2002) and hippocampal neurons, whereas MAPK signaling is involved in neuritogenesis. There are at least three possibilities for the PrP^c-STII complex formation: proteins can interact in the same (A) or in distinct cells (B) or STII can act as a secreted neurotrophic factor (C).

Discussion

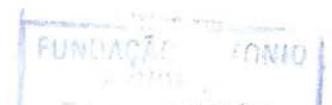
This investigation showed that: (a) the cellular prion protein (PrP^c) and its binding partner stress-induced protein 1 (STII) co-localize in hippocampal neurons; (b) interaction of STII with PrP^c mediated by their cognate binding domains induces both neuritogenesis and neuroprotection of hippocampal neurons in culture; (c) neuritogenesis induced by STII is mediated by the MAP kinase pathway, whereas neuroprotection induced by the same protein depends on a PKA pathway. These data add to the growing body of evidence, that PrP^c is involved in neurotrophic signaling within the central nervous system, and helps clarify its mechanisms.

It is becoming increasingly clear that PrP^c has a role in neuronal differentiation. Earlier studies from our group showed that PrP^c is the main cellular receptor for a peptide at the γ 1-laminin chain. This specific interaction between laminin and PrP^c induced neuritogenesis in mouse hippocampal neurons (Graner *et al.*, 2000a).

We also showed the participation of PrP^c in neurite adhesion and maintenance through its interaction with laminin (Graner *et al.*, 2000b). PrP^c has been proposed to be a cell surface adhesion protein and its early developmental distribution resembles that of adhesion molecules (Endo *et al.*, 1989). Recent studies using a time controlled transcardiac perfusion cross-linking procedure showed that proteins involved in cell adhesion and neurite outgrowth can be found in the molecular microenvironment of PrP^c in the living brain (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001; Schmitt-Ulms *et al.*, 2004). Furthermore, the laminin receptor (LPR/LR), required for cell differentiation and growth, was identified as a cell-surface binding partner of PrP^c (Gauczynski *et al.*, 2001; Hundt *et al.*, 2001). PrP^c also interacts with glycosaminoglycans expressed on the cell surface (Shyng *et al.*, 1995; Rieger *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2002). This is particularly relevant for brain development, because both laminin and glycosaminoglycans are developmentally regulated and contribute to axon growth and the formation of fiber tracts (Reichardt and Tomaselli, 1991). The abundant presence of PrP^c in elongating axons suggests a role for the protein in axon growth (Sales *et al.*, 2002), which is supported by data from *Prnp*^{0/0} mice, in which the hippocampal mossy fiber projection is disorganized (Colling *et al.*, 1997).

PrP^c activation by antibody cross-linking induces a signaling pathway that involves the tyrosine kinase p59fyn in a cell line capable of neuron-like differentiation (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). The p59fyn kinase has also been implicated in modulating axonal guidance of olfactory axons, which express high levels of PrP^c throughout life and mediate N-CAMs-induced neurite outgrowth (Morse *et al.*, 1998; Sales *et al.*, 1998; Beggs *et al.*, 1997; Kolkova *et al.*, 2000). Accordingly, recent findings show that PrP^c interacts directly with neuronal cell adhesion molecule (NCAM), leading to stabilization of the latter in lipid rafts where fyn is activated and induces NCAM-dependent neuritogenesis (Santuccione *et al.*, 2005). Nevertheless, the PrP^c binding site at NCAM was not characterized.

Fundação Antonia Prudente
Ana Maria de Aguiar Alves Kunitani
Coordenadora Pós-Graduação



Various studies provided evidence that PrP^c is implicated in neuroprotection. PrP^c has been reported to protect human primary neurons against Bax-induced cell death, either from its location at the cell surface through an unidentified signaling pathway or from the cytosol (Bounhar et al., 2001; Roucou et al., 2003). It was recently reported that several signal transduction pathways involved in survival are activated in mouse primary cerebellar granule neurons grown in PrP-coated tissue culture plates. In this preparation, homophilic PrP^c interaction led to activation of PKA, Src-related tyrosine kinases, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt, and MAPK/ERK kinases. Among downstream targets, increased Bcl-2 levels and decreased Bax levels were observed, consistent with PrP^c triggering survival signals (Chen *et al.*, 2003).

Investigation of PrP^c-interacting proteins is an important tool to understand not only cellular signaling triggered by, but also the biological function(s) related to PrP^c. This approach is more likely to reveal physiological functions than antibody-mediated cross-linking (Mouillet-Richard et al., 2000; Hugel et al., 2004; Monnet et al., 2004).

Accordingly, we have demonstrated that interaction of PrP^c with its ligand STI1 protein activates a PKA-dependent signaling pathway to rescue retinal cells from induced apoptosis (Zanata et al., 2002; Chiarini et al., 2002). Recently, Onodera and colleagues showed that PrP^c cooperates with STI1 to regulate SOD activity and consequently modulating cell survival (Sakudo et al., 2005).

The current experiments provided clear evidence that neuritogenesis induced by STI1 depends on the expression of PrP^c, and that MAPK family members are required for it. In turn, neuroprotection induced by STI1-PrP^c interaction in hippocampal neurons, similar to our previous studies in retinal cells, is mediated by a PKA signaling pathway.

It is interesting to notice that the concentration of STI1 required to promote neuroprotection is ten times higher than the one necessary to induce neuritogenesis. This can be due to the activation threshold of the distinct MAPK and PKA signaling pathways involved in each phenomenon.

Therefore, we propose a model in which PrP^c interacts with STI1 and transduces both a survival or protective signal through PKA, and a neuritogenesis/differentiation signal through the MAP kinase pathway in neuronal cells (Figure 9). The PrP^c-STI1 complex may be formed by proteins either in the same (Figure 9 A) or in distinct cells

(Figure 9 B). In our previous study we speculated that STII1 could act as soluble neurotrophic factor (Chiarini *et al.*, 2002) interacting with PrP^c. STII1 has indeed been found released by certain tumor cell lines (Eustace and Jay, 2004), glial cells and in lower amounts by neurons in culture (our unpublished results). Thus, there is a third possibility in which either astrocytes or neurons secrete STII1, which then may act as a paracrine or autocrine factor in neuronal differentiation (Figure 9 C).

The significance of the high levels of STII1 colocalized with PrP^c at the surface of the cell soma rather than in neurites, is not clear. The lack of detectable immunoreactivity to STII1 in neurites may be due either to low amounts of the protein at the surface, or to a true differential distribution. This, as well as the relationships between STII1 and NCAM (Santuccione *et al.*, 2005), both of which are involved in neuritogenesis mediated by PrP^c, remain to be addressed.

The results presented here advance a new biological function for STII1, support a significant role for PrP^c as a response mediator in both neuritogenesis and neuroprotection promoted by STII1, and provide further insight into the molecular basis of STII1-induced intracellular signaling. The roles of PrP^c in neuronal survival and neuritogenesis may be germane to loss-of-function components of the pathogenesis of prion diseases. Finally, the characterization of PrP^c ligands with neurotrophic activity is relevant both for developmental neurobiology as well as for pathology. These molecules may represent new targets for therapeutic intervention in neurodegenerative conditions.

Reference List

1. Audesirk G, Cabell L, Kern M (1997) Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 102: 247-260.
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JD, Smith JA, Struhl K. (1993) In: *Current Protocols in Molecular Biology* pp 3.17.1. New York: Wiley Interscience.
3. Beggs HE, Baragona SC, Hemperly JJ, Maness PF (1997) NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J Biol Chem* 272: 8310-8319.

4. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 276: 39145-39149.
5. Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* 67: 211-224.
6. Brown DR, Sassoon J (2002) Copper-dependent functions for the prion protein. *Mol Biotechnol* 22: 165-178.
7. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.
8. Carrigan PE, Nelson GM, Roberts PJ, Stoffer J, Riggs DL, Smith DF (2004) Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. *J Biol Chem* 279: 16185-16193.
9. Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003) Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22: 227-233.
10. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21: 3317-3326.
11. Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG (1997) Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* 755: 28-35.
12. Doherty P, Williams G, Williams EJ (2000) CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol Cell Neurosci* 16: 283-295.
13. Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28: 8380-8388.
14. Eustace BK, Jay DG (2004) Extracellular Roles for the Molecular Chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3.
15. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273: 18623-18632.
16. Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* 20: 5863-5875.

17. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000a) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 85-92.
18. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR (2000b) Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 482: 257-260.
19. Hernandez MP, Sullivan WP, Toft DO (2002) The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hsp90 molecular chaperone complex. *J Biol Chem* 277: 38294-38304.
20. Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
21. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Blattler T, Aguzzi A, Freyssinet JM (2004) Modulation of signal transduction through the cellular prion protein is linked to its incorporation in lipid rafts. *Cell Mol Life Sci* 61: 2998-3007.
22. Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J* 20: 5876-5886.
23. Kolkova K, Novitskaya V, Pedersen N, Berezin V, Bock E (2000) Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 20: 2238-2246.
24. Martins AR, Dias MM, Vasconcelos TM, Caldo H, Costa MC, Chimelli L, Larson RE (1999) Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J Neurosci Methods* 92: 25-29.
25. Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM, Brentani RR (1997) Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* 3: 1376-1382.
26. Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 512: 25-28.
27. Monnet C, Gavard J, Mege RM, Sobel A (2004) Clustering of cellular prion protein induces ERK1/2 and stathmin phosphorylation in GT1-7 neuronal cells. *FEBS Lett* 576: 114-118.

28. Morse WR, Whitesides JG, III, LaMantia AS, Maness PF (1998) p59fyn and pp60c-src modulate axonal guidance in the developing mouse olfactory pathway. *J Neurobiol* 36: 53-63.
29. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928.
30. Nicolet CM, Craig EA (1989) Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9: 3638-3646.
31. Nicotera P, Orrenius S (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23: 173-180.
32. Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS (2002) Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J* 368: 81-90.
33. Reichardt LF, Tomaselli KJ (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14: 531-570.
34. Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas CI, Weiss S (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 3: 1383-1388.
35. Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC (2003) Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* 278: 40877-40881.
36. Ruegg UT, Burgess GM (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10: 218-220.
37. Sakudo A, Lee DC, Li S, Nakamura T, Matsumoto Y, Saeki K, Itohara S, Ikuta K, Onodera T (2005) PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 14-19.
38. Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Fretier P, Moya KL (2002) Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci* 15: 1163-1177.
39. Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 10: 2464-2471.
40. Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169: 341-354.

41. Schmitt-Ulms G, Hansen K, Liu J, Cowdrey C, Yang J, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Baldwin MA (2004) Time-controlled transcatheter perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. *Nat Biotechnol* 22: 724-731.
42. Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* 314: 1209-1225.
43. Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA (1995) Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J Biol Chem* 270: 30221-30229.
44. van der SJ, Kana BD, Dirr HW, Blatch GL (2000) Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. *Biochem J* 345 Pt 3: 645-651.
45. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21: 3307-3316.

Curriculum Vitae

Angelita Gonzalez Muras
Brasileira, 38 anos.

FORMAÇÃO

Pós-Graduação: Doutorado em Ciências *stricto sensu* – concentração em Oncologia - realizado nos Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer e Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Desde agosto de 2000; conclusão prevista para março de 2005.

Superior: Farmácia-Bioquímica, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Concluído em março de 1992.

Idiomas: Inglês – avançado;
Espanhol - básico.

Informática: Microsoft Windows XP; Microsoft Office XP, Graphpad Prism, ImagePro Plus e Internet, como usuária.

PUBLICAÇÕES

Artigos científicos:

Muras,AG, Ribeiro,KC, Nomizo,R, Chammas,R, Martins,VR, “Cellular prion protein protects against experimental metastasis in a mouse model”, artigo em preparação;

Lima, FR, Muras,AG, Nomizo,R, Brentani,RR, Martins,VR, “Involvement of the cellular prion protein in the neuron-glia interaction”, artigo em preparação;

Lopes,MH, Hajj,GM, Muras,AG, Castro, RM, Linden,R, Brentani,RR, Martins,VR, “Distinct signaling pathways are required for neurite outgrowth and neuroprotection mediated by cellular prion protein and stress inducible protein”, artigo submetido.

Livro-texto:

Lopes, A., Iyeyasu, H., Lopes, L.F., Souza Almeida, E., Castro, R.M.R.P.S. - Oncologia para Graduação, editora Tecmedd, 2004 - capítulo 6 – Matriz Extracelular, Moléculas de adesão e Metástase.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

XXXI Reunião Anual SBBq, com a apresentação do trabalho "*Cellular prion protein participation in the tumoral process*", na forma de pôster; realizado no período de 19 a 21 de maio de 2002, Caxambu, MG.

II International Symposium on Extracellular Matrix, com a apresentação dos trabalhos

- "*Cellular prion protein participation in experimental tumorigenesis*" e
- "*Fibroblasts are refractory to superexpression of the cellular prion protein*", na forma de pôster, realizado de 7 a 10 de outubro de 2002, Angra dos Reis, RJ.

Simpósio Internacional Novas Abordagens Clínicas e Moleculares Voltadas para o Câncer, realizado no período de 8 a 10 de novembro de 2002, em São Paulo, SP.

XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, apresentando os trabalhos intitulados

- "*Importance of the PrPc-STII interaction for the neuronal plasticity mechanism*",
- "*Cellular prion protein participation in experimental tumorigenesis*", em forma de pôster; realizado de 27 a 30 de agosto de 2003, em Curitiba, PR.

Prion diseases: from basic research to intervention concepts, apresentando o trabalho "*Importance of the PrPc-STII interaction for neuronal plasticity mechanisms*" em forma de pôster; realizado de 8 a 10 de outubro de 2003, em Gasteig, Munique, Alemanha.

XXXIII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, apresentando o trabalho em forma de pôster "*STII modulates glioma proliferation*"; realizado de 15 a 18 de maio de 2004, em Caxambu, MG.

18th Meeting of European Association for Cancer Research, apresentando o trabalho em forma de pôster "*Cellular prion protein participation in experimental tumorigenesis*", realizado de 3 a 6 de julho de 2004, em Innsbruck, Áustria.

4th Forum of European Neuroscience, apresentando o trabalho em forma de pôster "*Involvement of the cellular prion protein in the neuron-glia interaction*"; realizado de 10 a 14 de julho de 2004, em Lisboa, Portugal.

XII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology and IX Ibero-American Congress of Cell Biology, apresentando os trabalhos em forma de poster

- "*HEK293T cell line as a model to evaluate cellular alterations caused by human prion protein polymorphisms*",
 - "*Involvement of STII, a co-chaperone protein, in the hippocampal neurogenesis mediated by cellular prion protein*",
 - "*STII binding to cellular prion protein modulates glioma proliferation*",
 - "*Involvement of the cellular prion protein in the astrocyte differentiation*",
- realizado de 15 a 18 de julho de 2004 em Campinas, SP.

III International Symposium on Extracellular Matrix, com a apresentação dos trabalhos

- *“Association between cellular prion protein and glial fibrillary in the astrocyte differentiation”*
- *“The PrPc-STII interaction in peripheral nerve: studies in axon transport and regeneration”*,
- *“Involvement of the cellular prion protein in the neuron-glia interaction”*
- *“Cellular prion protein expression in mammary tumors”*
- *“Cellular prion protein protects against experimental metastasis in a mouse model”*

realizado de 27 a 30 de setembro de 2004, em Angra dos Reis, RJ.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

De julho de 1992 a fevereiro de 2000 - Centro de Tratamento e Pesquisa - Hospital do Câncer - farmacêutica:

- dispensação de medicamentos por sistema de dose unitária;
- manipulação de fórmulas oficinais e magistrais.
- reconstituição e manipulação de fármacos antineoplásicos em área estéril;
- dispensação de medicamentos para uso domiciliar e orientação ao paciente quanto a posologia, reações adversas, interações medicamentosas, etc;
- acompanhamento de esquemas e protocolos terapêuticos;
- pesquisa bibliográfica de posologia, reações adversas e interações de medicamentos, compatibilidade e estabilidade de antineoplásicos em soluções para infusão, etc.;

De abril a outubro de 1991 - Hospital Universitário da USP - técnica de farmácia:

- auxílio na dispensação de medicamentos por sistema de dose unitária;
- manipulação de soluções nutritivas estéreis (nutrição parenteral).

De junho de 1988 a fevereiro de 1990 - Fundação Hospital Ítalo-Brasileiro Umberto I - técnica de farmácia

- auxílio na dispensação de medicamentos por sistema de dose individualizada;
- manipulação de formulações nutritivas estéreis (nutrição parenteral).