

ALINE MADELEINE MORGADO DE ARAÚJO

**Caracterização de moléculas envolvidas no desenvolvimento
de melanoma pela metodologia de *Phage display***

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

**São Paulo
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE MADELEINE MORGADO DE ARAÚJO

**Caracterização de moléculas envolvidas no desenvolvimento
de melanoma pela metodologia de *Phage display***

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Lopes

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

**São Paulo
2008**

Ficha catalográfica

Araújo, Aline Madeleine Morgado de
Caracterização de moléculas envolvidas no desenvolvimento de melanoma pela metodologia de *Phage display* / Aline Madeleine Morgado de Araújo – São Paulo, 2008.

xix, 83 f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.
Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

1. Melanoma murino 2. Proteoglicanos 3. *Phage display*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA

Chefe do departamento:

Prof. Dr. José Daniel Lopes

Coordenador do curso de pós-graduação:

Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

ALINE MADELEINE MORGADO DE ARAÚJO

**Caracterização de moléculas envolvidas no desenvolvimento
de melanoma pela metodologia de *Phage display***

Presidente da banca: Prof. Dr. José Daniel Lopes

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis

Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf

Dra. Juliana Luporini Dreyfuss

Dra. Mariangela Correa

Aprovada em: julho / 2008

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com auxílio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio e Zália,
e irmãos, Rene, Luciana e Laíse,
pelo apoio e compreensão,
por acreditarem e sonharem junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Daniel Lopes, por sua preciosa orientação, pela oportunidade e ensinamentos que jamais serão esquecidos. Minha eterna admiração.

À Profa. Dra. Clara Lúcia Barbieri, pelos ensinamentos, apoio, paciência e atenção com que sempre me tratou.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, em especial aos professores da Disciplina de Imunologia, Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis, Dra. Zulma Peixinho, Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro, Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, Dr. Joel Machado Jr., Dr. Mario Mariano pelas valiosas contribuições.

Aos professores Dr. Jorge Kalil, Dra. Helena Bonciani Nader e Dra. Luisa Lina Villa do INCOR, INFAR e Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, respectivamente, e seus alunos, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, em especial aos funcionários da Disciplina de Imunologia, Aparecido Mendes, Ivone Mozat, Zélia Pereira, Gisélia Lopes, Creusa Marina, Creusa Rosa, Eraldina do Nascimento e Geová dos Santos. A Mércia Maia, secretária da pós-graduação do departamento, pelo auxílio constante.

Às amigas e colaboradoras, Fabiana Aliperti e Tatiana I. Ricca, por estarem presentes em todos os momentos, pela atenção e prestimosa ajuda.

A Adriana e Fabiana Konno, pela amizade e companheirismo.

A todos os alunos e ex-alunos da Disciplina de Imunologia, Fernanda Staquicini, Érika Kioshima, Livia Pugliese, Priscila Penteado, Elizabeth Perez,

Guilherme Kiohara, Ana Flávia Vigna, Camila Caldini, Marcela Antônio, Renata Fantini, Márcia Guerreschi, Bruno Vivanco, Ronni Brito, Patrícia Xander, Fabiana Melo, Fernanda Molognoni, Amanda Gonçalves, Ana Paula Suenaga, Maiko Palos, e em especial à Carolina Hager e Juliana Maricato pelos momentos de ajuda e descontração.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabela.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
Abreviaturas de aminoácidos.....	xvii
Resumo.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 MELANOMA.....	5
1.2 MATRIZ EXTRACELULAR.....	7
1.2.1 Neoplasias e matriz extracelular.....	8
1.2.2 Glicosaminoglicanos.....	8
1.2.2.1 Condroitim sulfato.....	9
1.2.2.2 Dermatan sulfato.....	9
1.2.2.3 Ácido hialurônico.....	10
1.2.2.4 Heparan sulfato.....	10
1.2.2.5 Heparina.....	11
1.2.3 Proteoglicanos.....	12
1.2.3.1 Proteoglicano de heparan sulfato e progressão tumoral.....	13
1.3 MARCADORES MOLECULARES.....	17
1.3.1 Marcadores tumorais de melanoma.....	17
1.4 <i>PHAGE DISPLAY</i>	19
1.5 MODELOS ANIMAIS DE TRANSFORMAÇÃO.....	24
1.6 LINFÓCITOS B-1.....	25
1.7 CÉLULAS MELAN-A.....	28
1.8 LINFÓCITOS B-1 E CÉLULAS MELAN-A.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 SOLUÇÕES.....	33
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	33
3.2.1 Meios para cultivo de células.....	33
3.2.2 Meios para cultivo de bactérias.....	34

3.3 CULTURA DE CÉLULAS.....	34
3.4 CULTIVO DA BACTÉRIA <i>E. coli</i> K91Kan.....	35
3.5 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS.....	35
3.6 PHAGE DISPLAY.....	35
3.6.1 Biblioteca de <i>phage display</i>	35
3.6.2 <i>BRASIL</i> - seleção de fagos específicos para células melan-a transformadas.....	36
3.6.2.1 Pré-seleção e seleção de fagos ligantes de células melan-a transformadas.....	36
3.6.2.2 Larga escala.....	36
3.6.2.3 Precipitação dos fagos.....	37
3.6.2.4 Titulação dos fagos.....	37
3.6.3 Seleção de clones, reação em cadeia da polimerase (PCR).....	37
3.6.4 Sequenciamento do inserto para determinação do peptídeo apresentado pelo fago.....	38
3.6.5 Análise dos peptídeos selecionados.....	38
3.6.6 Ensaio de ligação.....	39
3.6.7 Ensaio de internalização.....	40
3.7 RT-PCR PARA DETECÇÃO DE mRNA ESPECÍFICOS PARA PERLECAM, SINDECAM-4 E VERSICAM.....	40
3.7.1 Extração de RNA total.....	40
3.7.2 Síntese da fita de DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	42
3.7.3 RT-PCR semiquantitativo.....	43
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1 IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM CÉLULAS MELAN-A E MELAN-A TRANSFORMADAS.....	45
4.2 SELEÇÃO DE CLONES, PCR E SEQUENCIAMENTO DO INSERTO PARA DETERMINAÇÃO DO PEPTÍDEO APRESENTADO PELO FAGO.....	47
4.3 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS.....	47
4.4 ANÁLISE DA AFINIDADE E ESPECIFICIDADE DOS FAGOS SELECIONADOS.....	49

4.5 EXPRESSÃO DE PROTEOGLICANOS POR CÉLULAS MELAN-A E MELAN-A TRANSFORMADAS.....	52
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura do bacteriófago.....	21
Figura 2. A metodologia de <i>phage display</i> foi utilizada para a identificação de moléculas diferencialmente expressas por células melan-a e melan-a transformadas.....	23
Figura 3. Seleção de fagos específicos para células melan-a transformadas.....	46
Figura 4. Análise eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.....	47
Figura 5. Ensaio de ligação de fagos por células melan-a e melan-a transformadas.....	50
Figura 6. Ensaio de internalização de fagos por células melan-a e melan-a transformadas analisadas por imunofluorescência.....	51
Figura 7A. Expressão de perlecam por células melan-a e melan-a transformadas.....	53
Figura 7B. Expressão de versicam por células melan-a e melan-a transformadas.....	53
Figura 7C. Expressão de sindecam-4 por células melan-a e melan-a transformadas.....	53

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Localização e função dos glicosaminoglicanos.....12

Tabela 2. Características estruturais e funcionais dos proteoglicanos.....15

Tabela 3. Seqüências de maior freqüência encontradas nas etapas 2 e 3 de seleção.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

BCR	receptor de células B
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
pb	pares de base
BSA	soro albumina bovina
°C	graus <i>Celsius</i>
CD	<i>cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CS	condroitin sulfato
DAPI	4',6'-diamidine-2-pheylindole
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNase	desoxiribonuclease
dNTP	desoxiribonucleosídeo-trifosfato
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	aceleração da gravidade
GAG	glicosaminoglicano
GAPDH	gliceraldeído-3'-fosfato dehidrogenase
HCl	ácido clorídrico
HS	heparam sulfato
Ig	imunoglobulina
kan	kanamicina
KCl	cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato de potássio

LB	Luria Bertani
M	molar
MEC	matriz extracelular
mM	milimolar
MM	meio mínimo
MCAM	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>
mg	miligrama
mL	mililitro
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
nM	nanomolar
nm	nanômetro
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico
ng	nanograma
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio
PBS	tampão salina fosfato
PCR	reação de polimerização em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PG	proteoglicano
pH	concentração de hidrogênio iônico
p/v	peso/volume
RT- PCR	reação de transcrição reversa seguida de PCR
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
SFB	soro fetal bovino
STAT	<i>signal transduction and activator of transcription</i>

sup	suplemento
TB	terrific broth
TBE	tampão tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
TU	<i>transforming units</i>
tet	tetraciclina
U	unidade
UV	ultravioleta
V	volts
v/v	volume/volume

ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	ABREVIATURA	LETRA CORRESPONDENTE
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

RESUMO

Melanoma é um tumor altamente metastático e invasivo que apresenta aumento na incidência de mortalidade nos últimos anos. Marcadores podem ser usados para diferenciar populações celulares não malignas de malignas, especialmente alterações de proteínas que sinalizam o desenvolvimento do câncer.

Melan-a é uma linhagem imortal de melanócitos pigmentados derivada de melanoblastos da epiderme normal de embriões de camundongos C57BL. Células melan-a não formam tumores em camundongos *nude* ou singênicos. Foram estabelecidas em nosso laboratório células transformadas derivadas da linhagem não tumorigênica melan-a, obtidas após co-cultivo com linfócitos B-1. Essas células de alto potencial metastático são capazes de formar tumores subcutâneos e metástases espontâneas no pulmão, constituindo importante ferramenta para o estudo de proteínas envolvidas em transformação e metástase.

O sistema de *phage display*, utilizando bacteriófagos contendo seqüências codificadas de peptídeos randômicos, permite varrer a superfície de células, tecidos ou órgãos em busca de novos marcadores moleculares. Utilizando este método além de outras abordagens, o objetivo deste estudo foi detectar marcadores que poderiam diferenciar populações celulares não malignas de malignas, especialmente alterações relacionadas ao câncer.

Em nosso modelo, utilizando a técnica de RT-PCR semiquantitativo, demonstramos que a expressão do esqueleto protéico de perlecan apresenta-se significativamente aumentado após a transformação maligna dos melanócitos melan-a. Células melan-a transformadas apresentam aumento na expressão de perlecan, diminuição de versicam e níveis inalterados de sindecam-4 quando comparado às células melan-a. Essas diferenças fenotípicas, que servem como

marcadores adicionais podem levar a um melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento do melanoma.

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm contribuído com relevantes conhecimentos sobre mecanismos essenciais que conferem à célula tumoral a capacidade de se desenvolver, deixar seu sítio primário, migrar e se instalar em outro tecido, contudo esse mecanismo ainda não é totalmente esclarecido.

Evidências sugerem que a tumorigênese é resultado de uma sucessão de alterações genéticas que coordenam a transformação maligna de células normais. Baseado em dados experimentais, Hanahan e Weinberg (2000) sugerem seis alterações essenciais na fisiologia de células normais que causam sua transformação maligna e que podem ser encontradas na maioria dos diferentes tipos de câncer: 1) ausência de controle do ciclo celular por fatores de crescimento, 2) insensibilidade a fatores inibitórios do crescimento, 3) mecanismos de evasão de apoptose, 3) potencial de replicação ilimitado, 4) angiogênese sustentada e 5) metástase.

Apesar da aquisição de autonomia do controle de ciclo celular ser uma explicação satisfatória para a transformação maligna, restam dúvidas sobre a participação de células constantemente presentes no microambiente tumoral, entre elas os fibroblastos, as células endoteliais e do sistema imune, todas capazes de transmitir e responder a estímulos heterotípicos. Nesse contexto, é possível considerar que células tumorais seriam capazes de subverter células normais a interagirem em seu microambiente, favorecendo seu crescimento e disseminação (Skobe and Fusenig, 1998; Kinzler and Vogelstein, 1998; Olumi *et al.*, 1999; Cordon-Cardo and Prives, 1999; Coussens *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 1999).

Da mesma forma, dentro de um tecido normal, vários sinais antiproliferativos atuam na manutenção da homeostase, incluindo fatores solúveis ou imobilizados na matriz extracelular e superfície de células. Células tumorais são capazes de burlar esse controle principalmente devido a alterações em proteínas responsáveis por sua progressão nas fases do ciclo celular. A proteína Rb é um dos principais alvos de mutações. Sua fosforilação permanente libera moléculas da família de fatores de transcrição E2F induzindo a proliferação de células não responsivas a fatores antiproliferativos que atuam normalmente na transição de G1/S. Além disso, uma das principais moléculas envolvidas na inibição da diferenciação celular é o produto do oncogene *c-myc*, que codifica para fatores de transcrição. A superexpressão da

oncoproteína *c-myc* favorece o crescimento de células indiferenciadas (Volpert *et al.*, 1997).

A capacidade de células tumorais em expandir sua população deve-se não só a maior proliferação, mas também a resistência à morte celular programada. Alterações em mecanismos envolvidos na indução de apoptose estão presentes em uma variedade de tumores. A primeira evidência de que a apoptose poderia estar envolvida na tumorigênese foi obtida em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie, que descreveram a presença de células apoptóticas em uma população em rápida proliferação após a retirada do estímulo. A descoberta do oncogene *bcl-2* em linfomas foliculares e sua atividade antiapoptótica permitiram o início dos estudos moleculares envolvidos na indução da morte celular programada (Korsmeyer, 1992; Vaux *et al.* 1988; Strasser *et al.*, 1990; McDonnell and Korsmeyer, 1991).

A resistência à apoptose pode ser adquirida mais comumente pela perda de reguladores pró-apoptóticos por mutações que envolvem principalmente o gene supressor de tumor p53. Outros mecanismos de resistência à morte por FAS/FAS-L foram descritos em carcinomas de cólon e pulmão (Pitti *et al.*, 1998).

Apesar da capacidade de auto-replicação e da resistência a apoptose convergirem com as principais causas de tumores, estudos realizados nos últimos 30 anos demonstram que muitas células tumorais adquirem outros mecanismos de regulação que permitem sua proliferação. A capacidade de replicação ilimitada deve-se principalmente à manutenção do telômero celular. Cerca de 85-90% das células malignas superexpressam a enzima telomerase, responsável pela adição de hexanucleotídeos no final do DNA telomérico (Bryan and Cech, 1999).

Da mesma forma, a manutenção de oxigênio e nutrientes por vasos sanguíneos é crucial para a sobrevivência de células normais ou neoplásicas, sendo a angiogênese um dos fenômenos mais controlados durante o desenvolvimento de tecidos ou injúria tecidual. Células tumorais são capazes de promover a formação de novos vasos sanguíneos favorecendo sua proliferação e disseminação.

A competência em induzir e sustentar a angiogênese parece ser adquirida por um processo multifatorial que ocorre durante o desenvolvimento do tumor e é dependente de um *switch* angiogênico a partir de vasos quiescentes. Células tumorais parecem iniciar o *switch* angiogênico por alterar o equilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos, principalmente por alterações em sua transcrição gênica. Muitos tumores apresentam superexpressão de VEGF e FGFs, enquanto a expressão de

inibidores como a trombospondina-1 e interferon- β encontram-se suprimidos (Volpert *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1995).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações das moléculas envolvidas no equilíbrio entre reguladores angiogênicos não foi completamente esclarecida. Resultados sugerem que trombospondina-1 pode ser positivamente regulada pela proteína p53 em alguns tipos celulares. Consequentemente, a perda de função de p53 causa diminuição na produção de trombospondina-1 (Dameron *et al.*, 1994). O gene VEGF também se encontra sob controle transcricional e a ativação do oncogene *ras* ou a perda do gene supressor de tumor VHL causa sua superexpressão em alguns tipos de células (Rak *et al.*, 1995).

Proteases controlam a função de ativadores e inibidores da angiogênese. Várias proteases liberam bFGF estocado na matriz extracelular e sua expressão coordenada com fatores pró e antiangiogênicos parece ser resultado de uma fina regulação homeostática da angiogênese de tecidos normais e da integridade vascular (Whitelock *et al.*, 1996).

Em conclusão, assim como a formação de tumores primários, a invasão de novos tecidos é dependente de todas as características já descritas. No entanto, a capacidade adicional adquirida por células invasivas que as torna capazes de formar metástases não foi ainda esclarecida.

Várias classes de proteínas têm sua expressão alterada em células metastáticas, incluindo moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz. Além disso, proteases extracelulares são associadas à progressão tumoral. Genes que codificam proteases encontram-se mais expressos enquanto seus inibidores são suprimidos (Werb, 1997; Stetler-Stevenson, 1999). Em muitos tipos de carcinoma, proteases degradantes de matriz são produzidas não somente por células epiteliais neoplásicas, mas também por células estromais e inflamatórias (Werb, 1997).

Apesar dos avanços em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e terapias adjuvantes, grande parte das mortes causadas por câncer são resultados da formação de metástases resistentes a terapias convencionais (Fidler 1978 e 2002). A heterogeneidade biológica de células neoplásicas que compõem subpopulações com diferentes propriedades angiogênicas, invasivas e metastáticas, preexistentes dentro da neoplasia (Fidler, 2002), além da influência do microambiente tumoral, representam as principais barreiras a serem ultrapassadas. Entender a origem das

metástases em níveis sistêmico, celular e molecular pode representar o cumprimento de um dos principais objetivos da pesquisa científica em câncer.

1.1 MELANOMA

Em 2005 o câncer foi responsável por 13% das mortes ocorridas no mundo, sendo que mais de 70% destas ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO, 2006). No ano passado, foram estimados 59.940 novos casos de melanoma nos Estados Unidos, com uma expectativa de 8.110 mortes (American Cancer Society, 2007). Estima-se que em 2008 dentre todos os tipos de câncer, o de pele será o mais incidente na população brasileira com 120.930 casos novos, dos quais 4,9% serão de melanoma (INCA, 2007). Mesmo sendo o tipo de câncer de pele mais raro, o melanoma é responsável pela maioria das mortes (aproximadamente 80%) relacionadas ao câncer de pele (Medic *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2005), sendo que apenas 14% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivem por cinco anos (American Cancer Society, 2003).

A maioria dos pacientes diagnosticados com melanoma primário é curado após excisão cirúrgica do tumor (Miller and Mihm, 2006). Porém, em estágios avançados raramente é tratável por não responder às formas de terapia utilizadas atualmente e por isso apresenta o prognóstico ruim com taxa de sobrevida de seis meses (Miller and Mihm, 2006; Wascher *et al.*, 2003). Diferente da maioria dos cânceres, o melanoma não está associado à idade, sendo um dos tipos de câncer mais comuns e letais entre pessoas na faixa dos 20 a 35 anos. Por afligir jovens e adultos na meia idade, o impacto socioeconômico e psicológico é enorme, pois há perda de produtividade desses indivíduos causada pela patologia (Tsao *et al.*, 2004; Houghton and Polsky, 2002).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma são histórico familiar, múltiplos nevos (benignos ou atípicos) e ocorrência de um melanoma prévio. Fatores de risco adicionais incluem sensibilidade ao sol, exposição solar excessiva e doenças imunossupressoras. Cada um desses fatores corresponde à predisposição genética ou estressor ambiental que contribuirão para a gênese do melanoma (Miller and Mihm, 2006). Aliás, o melanoma é visto como um dos melhores exemplos de como genética e meio ambiente interagem na patogenicidade do tumor

(Houghton and Polsky, 2002), já que sua incidência é influenciada pela cor da pele e parâmetros geográficos como altitude e latitude (Armstrong and Kricger, 2001).

Melanoma humano corresponde ao primeiro modelo empregado em estudos experimentais, uma vez que apresentam fácil adaptação à cultura de células e respondem fracamente aos tratamentos convencionais com quimioterapia e radioterapia (Houghton *et al.*, 2001). Originam-se de células pigmentadas, denominadas melanócitos, presentes na camada basal da pele e em outras superfícies epiteliais como nos olhos e ouvido interno (Herlyn *et al.*, 2000; Houghton *et al.*, 2001; Chudnovsky *et al.*, 2005). São originários da crista neural, migrando para a pele, mucosa ectodérmica, úvea e meninges durante a embriogênese.

Na pele, melanócitos normais permanecem sob controle de queratinócitos através de contato célula-célula mediado por E-caderina, molécula cuja expressão é diminuída em nevo e mais ainda em melanoma. A perda da expressão de E-caderina é compensada pela expressão de N-caderina, constituindo importante passo na transformação de melanócitos em melanoma. Após escape do controle exercido por queratinócitos, melanócitos transformados deixam a epiderme estabelecendo comunicação com fibroblastos, células endoteliais e outros componentes estromais da derme. Esses, por sua vez, liberam fatores de crescimento e produzem proteínas da matriz extracelular, que promovem crescimento e aumento da invasividade em melanócitos transformados (Bogenrieder and Herlyn, 2002). Assim, o desenvolvimento tumoral depende de uma série de eventos complexos influenciados coletivamente tanto por fatores intrínsecos à célula transformada quanto por fatores do microambiente tais como fatores de crescimento e citocinas (Smalley and Herlyn, 2003).

O melanoma cutâneo pode ser dividido em diversos subtipos conforme localização anatômica e padrão de crescimento (Chudnovsky *et al.*, 2005). De acordo com sua origem, os melanomas podem ser classificados como cutâneo, ocular, de mucosa ou de meninge.

Quanto à progressão, caracteriza-se por etapas que diferem no curso clínico e características histopatológicas (Li and Herlyn, 2000). A proliferação de melanócitos pode gerar nevo melanocítico benigno ou lesão pré-maligna designada nevo displásico, que em alguns casos é precursor da neoplasia. Durante processo de transformação maligna, células de melanoma passam por fase de crescimento radial (RGP) podendo ou não alcançar crescimento vertical (VGP). A fase de crescimento

radial correspondente à fase inicial do melanoma primário, caracterizado pelo crescimento horizontal na epiderme. Ainda nesse estágio, o melanoma é curável por excisão cirúrgica. Na fase de crescimento vertical, o melanoma encontra-se em estágio mais avançado e com repertório de moléculas de adesão alteradas. Nessa fase, a derme é invadida e o tumor adquire capacidade para metastatizar, culminando no último estágio do desenvolvimento que é formação de metástases em sítios distantes do local de origem do tumor primário (Li and Herlyn 2000; MacGary *et al.*, 2003; Chudnovskiy *et al.*, 2005). Alternativamente, como em todos os modelos de progressão, melanócitos imaturos podem originar qualquer uma das fases tumorais propriamente ditas (Clark *et al.*, 1984; Clark, 1991).

Embora caracterizados pelo alto potencial de malignidade, nem todas as células do melanoma primário estarão aptas a concluir com sucesso as etapas necessárias até desenvolvimento de metástases. Segundo Fidler (1978), metástase é um processo seletivo que representa a sobrevivência não randômica de células tumorais. Assim, pode-se concluir que metástases resultam do crescimento seletivo e não aleatório do tumor.

Embora haja na literatura inúmeros trabalhos com diferentes modelos (tecidos, linhagens celulares e anticorpos) indicando mudanças em várias moléculas envolvidas na gênese do melanoma, alterações responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do melanoma ainda não são totalmente conhecidas.

1.2 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa composta por quatro grandes classes de macromoléculas: colágeno, proteoglicano, glicoproteína e elastina (Hay, 1990). A MEC está dividida em membrana basal (MB), matriz conjuntiva e matriz sanguínea. Essa estrutura proporciona a formação de um arcabouço físico que promove sustentação da estrutura tecidual e conseqüentemente determina a hidratação da MEC e o volume do tecido. Mais ainda, cria espaços para o transporte de moléculas, participa da organização dinâmica e dá resistência às forças de compressão (Cooper, 2001; Alberts *et al.*, 1997).

As interações entre células e matriz extracelular são cruciais para determinar os padrões de comportamento celular tais como crescimento celular, morte celular, diferenciação e motilidade. O comportamento celular, por sua vez, é importante em

diversos mecanismos celulares como morfogênese, inflamação, resposta imune, invasão parasitária, transformação celular e metástase (Chammas and Brentani, 2002).

1.2.1 Neoplasias e matriz extracelular

Nas neoplasias, as interações entre células e MEC podem ser totais ou parcialmente alteradas e com isso influenciar na proliferação e invasão tumoral (Yurchenco and Schittny, 1990; Vlodavsky *et al.*, 1999; Wielenga *et al.*, 2000; Vlodavsky *et al.*, 2002). A interação de células tumorais com membrana basal e matriz extracelular no processo de invasão tumoral pode ser dividida em três etapas: (1) Degradação da MEC por enzimas secretadas pelas células tumorais (metaloproteinases, collagenases, plasmina, catepsinas, glicosidases). Essas enzimas estão associadas com invasão, pois levam à desorganização e a fragmentação dos componentes do estroma e da membrana basal (Liotta *et al.*, 1986; Tryggvason *et al.*, 1987; Yurchenco and Schittny, 1990); (2) Adesão da célula tumoral via receptores específicos na superfície celular, que geralmente interagem com componentes da MEC. Esses receptores podem reconhecer glicoproteínas, colágenos ou proteoglicanos presentes na MEC (Liotta and Rao, 1986; Liotta *et al.*, 1986); (3) Locomoção da célula tumoral na região da MEC previamente degradada pelas enzimas (Liotta *et al.*, 1986; Bernfield *et al.*, 1999).

1.2.2 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos que apresentam como estrutura básica unidades alternadas de hexosamina (α -D-glucosamina, β -D-glucosamina ou β -D-galactosamina) e um açúcar não nitrogenado, que pode ser ácido urônico (β -D-glucurônico ou α -L-idurônico) ou açúcar neutro (β -D-galactose), unidos por ligações glicosídicas (Brimacombe and Weber, 1964; Kjellén and Lindhal, 1991). As cadeias de GAGs são sintetizadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e são degradadas por ação de enzimas específicas nos lisossomos (Marks, 1994).

Os principais GAGs encontrados são condroitim 4-sulfato (C4S), condroitim 6-sulfato (C6S), dermatan sulfato (DS), heparam sulfato (HS), heparina (Hep), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH) (Tabela 1).

Esses compostos de natureza ácida possuem carga negativa devido presença de grupamentos sulfato na estrutura e/ou carboxilas dos ácidos urônicos. Devido alta densidade negativa, são altamente hidrofílicos e assim incorporam grande quantidade de água na estrutura (Hatae *et al.*, 1977). Os glicosaminoglicanos são divididos de acordo com: (1) tipo de açúcar não nitrogenado (AU ou Gal); (2) tipo de hexosamina (galactosamina ou glucosamina); (3) tipo de ligação inter ou intradissacarídica (alfa ou beta); (4) grau e posição (Meyer *et al.*, 1938).

1.2.2.1 Condroitim sulfato

Condroitim sulfato (CS) consiste do ácido D-glucurônico unidos por uma ligação β (1-3) a N-acetil-galactosamina-O-sulfatada. A sulfatação pode ocorrer nas posições 4 e/ou 6 da N-acetil-galactosamina. A ligação interdissacarídica é do tipo β (1-4). Os condroitim sulfatos quando degradados pela enzima bacteriana condroitinase AC (Suzuki *et al.*, 1968), formam dissacarídeos insaturados sulfatados na posição C4 ou C6 da N-acetil galactosamina, ou ainda, dissacarídeo não sulfatado (Michelacci and Dietrich, 1973).

Estudos de diversos tecidos neoplásicos mostraram aumento de condroitim sulfatos na matriz extracelular, principalmente do condroitim 6-sulfato. Durante a histogênese de invertebrados e vertebrados foi observada grande variação na concentração desses condroitins no espaço intercelular, com pico máximo no início da citodiferenciação, decrescendo gradativamente até o desaparecimento nos tecidos adultos (Dietrich *et al.*, 1980; Sampaio *et al.*, 1977; Sampaio and Dietrich, 1981; Jerônimo *et al.*, 1994; Berto *et al.*, 2001).

1.2.2.2 Dermatam sulfato

O dermatam sulfato (DS) difere do condroitim sulfato por apresentar ácido β -D-glucurônico, ácido α -L-idurônico ligado a N-acetil D-galactosamina 4 sulfatada, através de uma ligação α (1-3) (Brimacombe and Weber, 1964). As ligações hexosaminídicas são do tipo β (1-4). Igualmente ao condroitim sulfato, o dermatam sulfato de diferentes origens é um polissacarídeo heterogêneo ou híbrido, pois além de variar de acordo com o tipo de ácido urônico, varia também segundo o grau e posição da sulfatação que na maioria das vezes ocorre no C-4, mas pode ocorrer também no C-6, em ambos, ou na posição C-2 do ácido idurônico (Fransson, 1968;

Fransson and Malmström, 1971; Malmström and Fransson, 1971; Población and Michelacci, 1986; Petricevich and Michelacci, 1990).

1.2.2.3 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo que não está covalentemente ligado à proteína, sendo constituído por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido D-glucurônico (GlcUA) e *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas β (1-3) e β (1-4) intra e interdissacarídica, respectivamente. A densidade de carga negativa dessa molécula é conferida pelos grupamentos carboxílicos, uma vez que não apresenta sulfatação.

No câncer, o ácido hialurônico pode promover crescimento neoplásico e metástase. Células neoplásicas exibem diversos sítios de ligação para esse glicosaminoglicano, como CD44 e RHAMM (molécula que faz o reconhecimento do AH nos processos de migração específica em vários tipos celulares), e sua adesão pode influenciar na mobilidade celular (Kim *et al.*, 2004; Delpech *et al.*, 1997).

AH apresenta importante papel na progressão neoplásica, sendo que muitas neoplasias contêm elevados níveis de AH e em alguns casos, o nível de AH é prognóstico de progressão maligna (Toole, 2002). Por outro lado, AH implica na regulação da condução da neoplasia maligna, por exemplo, no ancoramento independente do crescimento maligno (Toole, 2002), motilidade das células neoplásicas (Hayen *et al.*, 1999), secreção das metaloproteinases matriciais (Zhang *et al.*, 2002) como também, na angiogênese neoplásica (Liu *et al.*, 2001).

1.2.2.4 Heparan sulfato

Heparan sulfato (HS) contém D-glucosamina (N-acetilada ou N-sulfatada) ligada ao ácido β -D-glucurônico ou α -L-idurônico por uma ligação do tipo α (1-4). (Silva and Dietrich, 1975).

O heparan sulfato é o mais complexo dos glicosaminoglicanos, sendo constituídos por pelo menos quatro tipos de unidades dissacarídicas que se diferenciam pelo número de grupamentos sulfato e a posição que se ligam: dissacarídeo 2,6-dissulfatado, dissacarídeo N-acetilado 6-sulfatado, dissacarídeo N-sulfatado e dissacarídeo N-acetilado (não sulfatado) (Dietrich *et al.*, 1979). Em alguns tipos de heparan sulfato pode ocorrer também dissacarídeos trissulfatados com grupamento sulfato extra ligado ao ácido urônico (Nader *et al.*, 1987).

A proporção das unidades dissacarídicas do heparam sulfato varia de acordo com o tecido e a espécie de origem (Silva *et al.*, 1976; Dietrich *et al.*, 1999,1983) e quanto ao grau de sulfatação e acetilação.

O heparam sulfato pode participar no processo de divisão celular promovendo a proliferação celular ou atuando como agente antimitogênico. O HS pode ser estimulador do crescimento celular quando atua como co-receptor para fatores de crescimento, ou pode ser antimitogênico, quando presente no meio de cultura. Atua neutralizando a atividade mitogênica dos fatores de crescimento, interferindo na ligação do fator ao seu receptor (Gambarini *et al.*, 1993; Porcionatto *et al.*, 1999). A heparina e o heparam sulfato regulam uma variedade de processos biológicos, incluindo hemostasia, inflamação, angiogênese, crescimento celular, adesão celular entre outros.

1.2.2.5 Heparina

A heparina (Hep) é constituída por resíduos alternados de ácido urônico unido por ligação glicosídica do tipo (1-4) a uma α -D-glucosamina (Hoffman and Meyer, 1962). O ácido α -L-idurônico tem uma participação significativa na constituição da heparina, ocorrendo com variação de 70-80% e apresentando intensa sulfatação (70-90%) em C2 (Wolfrom *et al.*, 1971; Perlin *et al.*, 1971). Pelo alto teor de sulfatação, juntamente com efeito dos grupos carboxila, a heparina é considerada o polieletrólito natural que apresenta maior número de cargas negativas.

Diferentemente do heparam sulfato, a heparina está presente em alguns vertebrados, porém ausente ou em menor quantidade no cérebro, músculo e rim de muitas espécies (Nader and Dietrich, 1989; Nader *et al.*, 1999).

GAG	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÕES
HEPARAM SULFATO	Todos os tecidos. Superfície celular, matriz extracelular e membrana basal	Molécula de adesão e reconhecimento celular. Divisão celular
CONDROITIM SULFATO	Matriz de tecidos conjuntivos, cartilagens, ossos, vasos sanguíneos. Matriz de tecidos embrionários e tumorais	Crescimento e ossificação. Proliferação celular
DERMATAM SULFATO	Predominante em tecidos conjuntivos densos, intestinos, pele e tendão	Relacionada com a organização, velocidade de deposição e manutenção das fibrilas de colágeno
ÁCIDO HIALURÔNICO	Tecido conjuntivo, cordão umbilical, líquidos sinovial e amniótico, matriz extracelular, humor vítreo e cartilagem	Lubrifica e protege as articulações, retém água na matriz, interage com outros proteoglicanos
HEPARINA	Distribuição irregular. Mastócitos, pulmão, pele e intestino de adultos. Exclusivamente em tecidos hematopoiéticos e fetais	Função biológica possivelmente associada com defesa do organismo. Potente anticoagulante e antitrombótico
QUERATAM SULFATO	Estroma da córnea e cartilagem articular adulta	Confere transparência óptica à córnea. Processos de crescimento

Tabela 1. Localização e função dos glicosaminoglicanos (Escudero, 2002).

1.2.3 Proteoglicanos

Todos glicosaminoglicanos ocorrem nos tecidos sob forma de proteoglicanos (PGs), com exceção do ácido hialurônico que é encontrado como cadeia polissacarídica livre (Esko, 1991). Os PGs são constituintes da superfície celular, MEC, MB (Dietrich, 1984; Nader and Dietrich, 1989) e são macromoléculas compostas de esqueleto protéico ao qual estão covalentemente ligadas uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos e oligossacarídeos do tipo O-ligados e/ou do tipo complexo N-ligados. Os proteoglicanos estão presentes em grandes quantidades na matriz extracelular (versicam e agregam) e na superfície celular (glicam e sindecam) e estão envolvidos em processos celulares fundamentais como proliferação celular,

angiogênese, morfogênese e diferenciação celular (Hascall and Hascall, 1981; Lindahl and Höök, 1978; Chiarugi and Vannucchi, 1976).

Existem três possíveis classificações para proteoglicanos que são baseadas em: (1) localização celular; (2) tipo de glicosaminoglicano; (3) seqüência de aminoácidos do esqueleto protéico.

A classificação pela localização celular divide os proteoglicanos em três categorias: intracelular, superfície celular e extracelular. A classificação pelo tipo de glicosaminoglicano presente não tem sido mais utilizada, pois existem proteoglicanos que possuem mais de um tipo de glicosaminoglicano, o que dificulta a classificação. A classificação pela homologia do esqueleto protéico refere-se à atividade biológica ou a seqüência de aminoácidos.

Há indícios de que essas macromoléculas possam atuar como conectoras entre os ambientes intra e extracelulares, estando relacionadas com transdução de sinais biológicos. Outras funções relacionadas aos PGs são cicatrização, divisão e crescimento celular e imunidade (Iozzo and San Antonio, 2001). A tabela 2 apresenta características estruturais e funcionais de alguns proteoglicanos.

1.2.3.1 Proteoglicano de heparam sulfato e progressão tumoral

O proteoglicano heparam sulfato (PGHS) constitui a maior classe de proteoglicanos encontrados na matriz extracelular, membrana basal e superfície celular associado com membrana plasmática. São macromoléculas formadas por esqueleto protéico ao qual estão ligados covalentemente a cadeias de glicosaminoglicanos (heparam sulfato) (Gallagher, 1989; David, 1993).

O entendimento da atividade biológica dos PGHS baseia-se essencialmente na diversidade estrutural das cadeias polissacarídicas (Bernfield *et al.*, 1999).

Assim, a determinação da seqüência das unidades dissacarídicas do heparam sulfato em tecidos embrionários, adultos normais e neoplásicos de diferentes patologias, bem como de células normais e células mantidas em cultura fornecem informação sobre atividade biológica desses compostos (Dietrich *et al.*, 1977; Dietrich and Armelin, 1978; Pinhal *et al.*, 1994; Porcionatto *et al.* 1999).

Na grande maioria das vezes são as cadeias de heparam sulfato que determinam o papel biológico dessa classe de macromoléculas, agindo no controle de mecanismos fisiológicos normais e patológicos, tais como morfogênese, reparo de tecidos, inflamação, vascularização, proliferação celular e metástases tumorais

(Sanderson, 2001), porém, deve-se salientar que existem casos em que o esqueleto protéico do proteoglicano também possui papel importante (Bernfield *et al.*, 1999).

A penetração de células tumorais através da membrana basal dos vasos sanguíneos e linfáticos é um passo crucial no processo de metástase (Kosir *et al.*, 1999). Dentre as várias alterações que ocorrem na superfície celular e matriz extracelular, um dos eventos importantes observados é a quebra das cadeias de heparam sulfato do PGHS presente na superfície celular e na MEC, os quais participam da interação célula-célula e células-MEC (Bernfield *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2001).

Os PGHS podem potencializar a interação de fatores de crescimento solúveis com seus receptores de superfície celular (Gambarini *et al.*, 1993; Zcharia *et al.*, 2004). Células tumorais em cultura apresentam aumento na expressão de PGHS presente na fração celular e secretado para meio de cultura (Lopes, 2004). O heparam sulfato tem importante função na divisão e ciclo celular (Dietrich and Armelin, 1978; Porcionatto *et al.*, 1999).

As cadeias HS podem estar ligadas a diferentes esqueletos protéicos. Esses esqueletos protéicos podem ser pertencentes à família do glipicam (ancorados por glicosil-fosfatidil-inositol), perlecam (PGHS de membrana basal) e sindecam (presente na superfície celular, ancorados através de uma porção transmembrânica hidrofóbica) (Kjellén and Lindahl, 1991; Salmivirta and Jalkanen, 1995; Esko and Lindahl, 2001).

Na matriz extracelular tem sido identificados PGHS como perlecam, colágeno XVIII e agrim, enquanto que na superfície celular encontram-se as famílias dos sindecans e dos glipicans.

Sabe-se que o perlecam está envolvido na migração, adesão e proliferação celular. É um proteoglicano amplamente expresso em todas as membranas basais e influencia o extravasamento de células malignas. Diversos relatos têm apontado o perlecam na mudança qualitativa e quantitativa do fenótipo neoplásico. A expressão de perlecam pode ser fundamental para o início da invasão (Cohen *et al.*, 1994).

O complexo pleiotrópico do perlecam sugere que a produção desse gene está envolvida em diversos processos, em ambos os estágios precoces e tardios da embriogênese, como também em doenças humanas como câncer e diabetes (Iozzo *et al.*, 1994). Perlecam é um potente indutor do crescimento tumoral e angiogênese *in vivo* e é alvo para intervenções terapêuticas na modulação da progressão tumoral podendo melhorar o tratamento de câncer (Sharma *et al.*, 1998).

PROTEOGLICANO	GAG (NÚMERO/TIPO)	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO
PROTEOGLICANOS INTRACELULARES			
CROMOGRANINA A	0-1 / CS	Grânulos, cromafins	Condensação granular
SERGLICIM	10-15 / CS; DS; HEP	Células mielóides, mastócitos, plaquetas	Ligação a proteases, condensação granular, processos inflamatórios
PROTEOGLICANOS DE SUPERFÍCIE CELULAR			
FAMÍLIA DOS SINDECANS	2-3 / HS 1-3 / CS	Epitélio, fibroblasto, endotélio, sistema nervoso, células musculares lisas	Morfogênese, adesão celular e atividade anticoagulante
FAMÍLIA DOS GLIPICANS	3-4 / HS	Epitélio, fibroblasto, sistema nervoso central	Endocitose e coagulação
Proteoglicanos facultativos			
INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$	nd / CS; HS	Células de melanoma humano, osteossarcoma humano	Estabiliza a interação com a fibronectina
BETAGLICAM	0-4 / CS; HS	Fibroblastos	Receptor do TGF- β
CADEIA INVARIANTE	0-1 / CS	Macrófagos	Processamento antigênico
CD 44	0-4 / CS; HS	Linfócitos e epitélio	Interação célula-célula
RECEPTOR DE TRANSFERRINA	4-6 / HS	Fibroblastos	Mediar a captação de transferrina
TROMBOMODULINA	0-1 / CS	Endotélio	Controle da coagulação
NG2	2-3 / CS	Células neurais, mesênquima	Ligação ao colágeno tipo VI e adesão celular
PROTEOGLICANOS DE MEMBRANA BASAL			
AGRIM	3 / HS	Junções neuromusculares, membrana basal renal e de pulmão	Regulação do crescimento axonal, interação célula-célula
BAMACAM	3 / CS	Membrana basal	Estabilidade da membrana

LEPRECAM	nd / CS	Membrana basal	Não definida
PERLECAM	3 / CS; HS	Membrana basal, cartilagem	Estrutural
PROTEOGLICANOS DE MATRIZ EXTRACELULAR			
Família dos "Hyalectans"			
AGRECAM	~ 100 / CS 20-30 / QS	Cartilagem, cérebro, vasos sanguíneos	Suporte mecânico, transporte de soluto
BREVICAM	1-3 / CS	Cérebro	Não definida
NEUROCAM	3-7 / CS	Cérebro, cartilagem	Não definida
VERVICAM	10-30 / CS; DS	Tecido embrionário	Orientação da migração da crista neural
Família "Leucine-Rich"			
BIGLICAM	2 / CS; DS	Tecido conjuntivo	Adesão celular, fibrogênese, regulação hematopoiética
DECORIM	1 / CS; DS	Tecido conjuntivo, ossos, dentes	Adesão celular, fibrogênese
EPIVICAM	2-3 / CS; DS	Cartilagem epifisária	Não definida
FIBROMODULINA	2-3 / QS	Tecido conjuntivo	Adesão celular, fibrogênese
LUMICAM	3-4 / QS	Córnea, intestino, fígado, músculo e cartilagem	Transparência da córnea e outras funções não definidas
MIMECAM OU OSTEOGLICINA	2-3 / QS	Córnea e tecido conjuntivo	Não definida
OSTEOADERINA	2-3 / QS	Ossos	Promove ligação nas células pela integrina $\alpha\beta3$
PRELP	2-3 / QS	Tecido conjuntivo	Não definida
QUERATOCAM	3-5 / QS	Córnea e esclera	Não definida

Proteoglicanos facultativos			
COLÁGENO	1 / CS; DS	Cartilagem e humor vítreo	Ligação na banda D do colágeno tipo II
APICAM	nd / CS	Cérebro	Envolvimento na doença de Alzheimer
FOSFOCAM	nd / CS	Cérebro	Modulação de interações celulares no cérebro
TESTICAM	1-2 / HS; CS	Testículos e cérebro	Não definida

nd: não determinada.

Tabela 2. Características estruturais e funcionais dos proteoglicanos (Escudero, 2002).

1.3 MARCADORES MOLECULARES

A procura de marcadores moleculares com potencial diagnóstico e terapêutico é uma árdua tarefa e um dos principais objetivos da ciência médica. A pesquisa básica tem sido fundamental nesse processo, não apenas identificando tais alvos, mas também auxiliando no desenvolvimento de fármacos, vacinas, métodos diagnósticos e outros insumos. Com o desenrolar dos diversos projetos genomas e o início da era dos proteomas, metodologias que pudessem lidar com quantidades massivas de informações (manipuladas ou geradas durante os estudos) se tornaram quase que ferramentas obrigatórias em centros de pesquisa, impulsionados também pela competição com a iniciativa privada. Centrais de bioinformática comparam genomas em busca de novos genes; milhares de fragmentos de transcritos celulares (ESTs) são seqüenciados e comparados a bancos de dados com finalidade de encontrar novos genes; técnicas de separação de proteínas e peptídios associados a métodos cada vez mais sofisticados e sensíveis de espectroscopia de massa buscam a identificação de cada proteína expressa numa célula, tecido ou órgão; análises comparativas entre regiões não transcritas de mRNAs (SAGE), procuram identificar transcritos específicos de determinadas células ou tecidos.

1.3.1 Marcadores tumorais de melanoma

Moléculas que distinguem tumores da linhagem melanocítica de linhagens não melanocíticas são classificados como marcadores de diferenciação. Atualmente,

alguns dos marcadores de diferenciação empregados em melanoma são as proteínas S100, gp100/HMB-45, tirosinase, MART-1/Melan-A e antígeno de alto peso molecular associado ao melanoma (HMW-MAA). Em imunohistoquímica, o antígeno S100 apresenta boa sensibilidade, uma vez que é encontrado em quase todas as fases do desenvolvimento tumoral. Contudo, esse marcador apresenta baixa especificidade porque também é expresso por células não melanocíticas. Por sua vez, antígeno melanossomal gp100/HMB-45 é específico para células pigmentadas, mas pouco sensível. O mesmo ocorre para outros antígenos que correspondem às enzimas relacionadas a melanogênese ou produtos advindos da síntese de melanina e melanossoma, de forma que geralmente é utilizada combinação de S100 com pelo menos dois outros antígenos de diferenciação melanocítica. A enzima tirosinase representa potente marcador para melanoma, já que a expressão do seu gene é restrita às células de origem melanocítica. Além disso, em melanomas grandes quantidades de mRNA para essa proteína são detectadas, o que favorece o diagnóstico por técnicas de hibridização *in situ*.

Outras moléculas são consideradas marcadores de progressão em melanomas pelo fato de serem expressas em apenas uma ou poucas fases durante o desenvolvimento do tumor e distinguem lesões benignas de malignas. Esses marcadores são derivados predominantemente de melanócitos, embora alguns componentes do estroma também tenham representatividade nesse grupo. Significativo número de marcadores de progressão tem sido descritos e podem ser caracterizados de acordo com a função biológica (de Wit *et al.*, 2004).

Melanomas expressam antígenos intracelulares reconhecidos por linfócitos T citotóxicos, dos quais se destacam os da família MAGE (Van den Eynde *et al.*, 1995). A família MAGE compreende 12 genes conhecidos sendo que seis deles são expressos por tumores e não por células normais, exceto células da placenta e testículo (Lassam and Bickford, 1992; Sauter and Herlyn, 1998).

De maneira geral, o diagnóstico de lesões melanocíticas pode ser obtido através da análise minuciosa de cortes histológicos convencionais. Entretanto, marcadores tumorais são de suma importância para diagnóstico de melanomas pobremente diferenciados ou que apresentam padrão histológico heterogêneo. Nesses casos, a partir da imuno-histoquímica pode ser confirmada a origem melanocítica e ainda o tipo da lesão proliferativa (benigna ou maligna). Para prognóstico da doença, alguns critérios analisados conjuntamente como espessura

da lesão, ulceração e ainda características histológicas tais como profundidade, taxa mitótica, presença de linfócitos infiltrados e vascularização, revelam o grau de agressividade das células tumorais no melanoma primário. Assim como para diagnóstico, resultados obtidos por imuno-histoquímica contribuem para prognóstico correto do melanoma. Em conseqüência, novos marcadores de diferenciação e progressão são sempre necessários e de grande utilidade para prognóstico e diagnóstico precoce de melanomas.

De modo geral, o desenvolvimento do câncer é um processo com muitas etapas envolvendo genes de supressão tumoral e oncogenes, eventos que ocorrem pré ou pós transcricionalmente e irão refletir mudanças distintas em uma grande quantidade de proteínas.

Proteínas participam de funções celulares e a análise da expressão diferencial dessas moléculas em tecidos no estado normal e patológico, permite entender melhor os mecanismos celulares envolvidos na doença. A identificação de mudanças na expressão de proteínas durante o processo de desenvolvimento da neoplasia, pode conduzir a descobertas tanto de marcadores protéicos como de novas e melhores estratégias de detecção precoce, diagnóstico e terapia. Visto que, marcadores podem ser usados para diferenciar populações celulares não malignas e malignas, especialmente alterações de proteínas inicialmente expressas que sinalizam desenvolvimento do câncer (Cazares *et al.*, 2002), a análise comparativa e identificação de diferentes proteínas encontradas são essenciais para entender melhor esses eventos (Wilson *et al.*, 2004). Uma das técnicas utilizadas na busca de moléculas que possam elucidar mecanismos de transformação envolvidos no processo oncogênico é o *phage display* de peptídeos.

1.4 PHAGE DISPLAY

Phage display de peptídios consiste em uma coleção de bilhões de peptídios apresentados na superfície de bacteriófagos (vírus de bactéria) que podem ser utilizados para identificar ligantes de qualquer molécula de interesse. Mais ainda, essa coleção de peptídios pode ser utilizada para varrer a superfície de células, tecidos ou órgãos, em busca de novos marcadores moleculares. O *phage display* é uma poderosa ferramenta que não apenas permite a identificação de novos alvos terapêuticos, mas também fornece informações importantes com relação à atividade

biológica dos alvos identificados. Os peptídios isolados através dessa metodologia, assim como seus respectivos receptores, podem ser rapidamente levados à clínica, seja como alvo diagnóstico (Mintz *et al.*, 2003), agentes carregadores de drogas (Arap *et al.*, 1998; Ellerby *et al.*, 1999), vetores para terapia gênica (Trepel *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2003), entre outras aplicações.

Bacteriófagos filamentosos (gênero *Inovirus*) pertencem a um grupo de vírus de genomas circulares e DNA de fita simples que são envolvidos por longo capsídio cilíndrico. A classe Ff, da qual fazem parte os fagos Fd e M13, têm sido amplamente estudados. Como o nome sugere, fagos Ff utilizam a estrutura conjugativa do F-pilus como receptor para infecção e são, portanto, específicos para *Escherichia coli*. Esses fagos não matam a bactéria hospedeira durante processo replicativo. O genoma do bacteriófago é sintetizado a partir de um intermediário dupla fita, enquanto as proteínas do capsídio são produzidas no citoplasma e transportadas para região periplásmica da membrana celular. Novas partículas virais são então montadas e secretadas a partir dessas regiões específicas da membrana. A bactéria tolera muito bem esse processo e continua crescer e se dividir. Inicialmente há uma produção de ~1.000 partículas virais durante a primeira geração e então 100-200 partículas nas gerações seguintes, resultando numa produção total de 10^{11} - 10^{12} partículas virais por mililitro de cultura. A estrutura e o modo de replicação dos fagos filamentosos o tornaram importante ferramenta de laboratório. Podem ser utilizados como vetores de clonagem, já que há inserção de fragmentos de DNA em regiões não essenciais do genoma do fago, que resultam em partículas virais mais longas contendo uma cópia do inserto de DNA na forma de fita simples. Toleram relativamente bem a inserção de pequenas sequências peptídicas, fundidas a diversas proteínas capsídicas (pIII, pVIII, pVI, pX) sendo portanto, excelentes vetores para apresentação de peptídios e proteínas.

A construção da biblioteca começa pelo desenho e síntese de um oligonucleotídeo degenerado que irá codificar a sequência aleatória de peptídios apresentada pelo fago. Cada resíduo da sequência recombinante geralmente é codificada por um códon degenerado NNK ou NNS (N = qualquer nucleotídeo A, G, C ou T; K = G ou T; S = G ou C). Ambos (NNK e NNS) codificam para os 20 aminoácidos, incluindo um códon de terminação (amber) e com uma distribuição idêntica no número de aminoácidos gerados (3 códons para Arg, Leu e Ser; 2 códons para Pro, Val, Gly, Ala, Thr; 1 códon para os demais 12 aminoácidos).

Em seguida deve-se escolher o vetor apropriado, isto é, em qual proteína do capsídio o peptídeo será apresentado. As proteínas pIII e pVIII são as mais utilizadas, sendo pIII a mais versátil e de fácil manipulação. Porém, pIII é expressa com apenas 3-5 cópias por partícula viral, enquanto ~3000 cópias da proteína pVIII podem ser encontradas por vírus (Smith and Scott, 1993). Entretanto, por ser muito pequena (50 aminoácidos) e praticamente a única constituinte do capsídios, modificações na proteína pVIII frequentemente inviabilizam a partícula viral. No estudo aqui proposto, utilizaremos bibliotecas desenhadas e construídas para expressar pequenos peptídios (5-15 aminoácidos) na proteína pIII (Figura 1). Mais detalhes com relação às opções de vetores e tipos de *phage display* podem ser encontrados na literatura (revisto por Barbas III *et al.*, 2001).

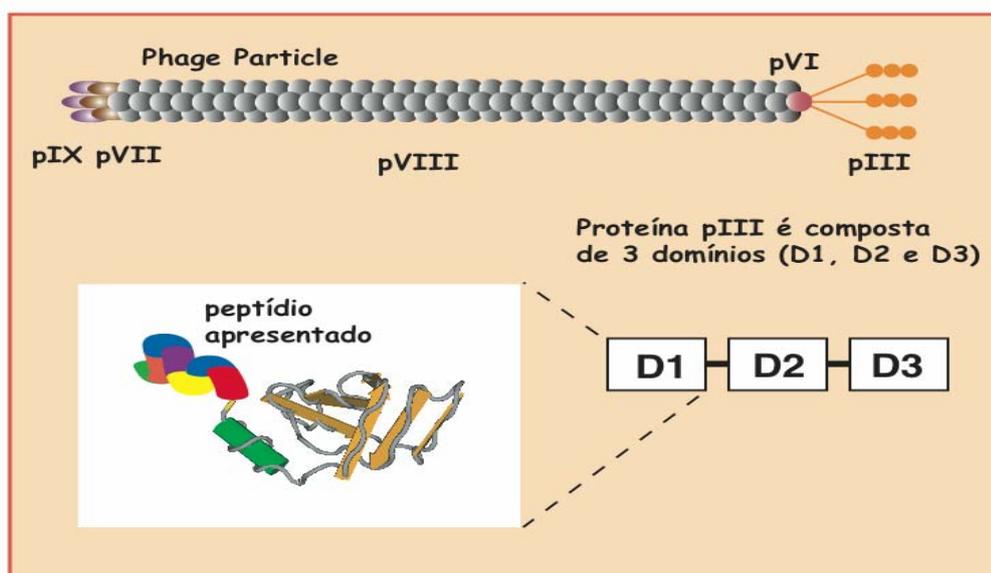


Figura 1: Esquema da estrutura do bacteriófago. Pertence a um grupo de vírus bacterianos com fita única de DNA envolta dentro de um longo capsídeo protéico cilíndrico. A proteína pVIII é a principal formadora do capsídeo protéico e a proteína pIII é a que utilizamos para a apresentação dos peptídeos nesse estudo. pVI, pVII e pXIX representam outras proteínas formadoras da partícula viral.

Diversos tipos de bibliotecas podem ser construídas. As mais simples, denominadas de lineares, contêm apenas a sequência aleatória de aminoácidos (geralmente entre 5 e 15 resíduos) e são chamadas de X_n , onde n representa o número de aminoácidos encontrados (por exemplo, X_7 para 7 aminoácidos, X_{15} para 15 aminoácidos, etc). As bibliotecas mais utilizadas em nossos estudos geralmente contêm um ou dois resíduos de cisteínas, criados durante o planejamento e

construção da biblioteca. Esses resíduos de cisteína precedem ou flanqueiam o inserto de aminoácidos aleatórios, formando pontes de dissulfeto e restringindo o grau de liberdade do peptídeo. Essas bibliotecas são denominadas de bibliotecas cíclicas (CX₁₀, CX₇C, etc). As bibliotecas a serem utilizadas nesse projeto foram produzidas nos laboratórios do Dr. Wadih Arap e Renata Pasqualin (UT - MD Anderson Cancer Center, USA) e Dr. Erkki Koivunen (Univesidade de Helsinke, Finlândia).

Geralmente, nessa técnica, os peptídeos identificados apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo, por exemplo, no caso de um receptor de superfície, o peptídeo assemelha-se a uma proteína ligante do receptor, competindo com aquela ligação (Jouault *et al.*, 2001; Giordano *et al.*, 2001). O processo de seleção de peptídeos ligantes mais recomendado é aquele realizado diretamente na superfície da célula. Entretanto, a realização desse processo em células apresenta alguns empecilhos como o reconhecimento de clones inespecíficos quando a coleção de fagos é incubada com a suspensão de células e o elevado número de lavagens requeridas para remover esses fagos inespecíficos. Além disso, células e ligantes em potencial podem ser perdidos durante as repetidas lavagens que além de trabalhosas, são ineficientes (Giordano *et al.*, 2001).

Para melhorar o processo de seleção de fagos ligantes a células vivas, uma nova metodologia que consiste na separação de células e fagos através de uma única centrifugação foi desenvolvida. Esse método de varredura, seleção e identificação de receptores de superfície celular foi designado *BRASIL – Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*, (Giordano *et al.*, 2001), e é baseado em centrifugações de células anteriormente incubadas com fagos que expressam na superfície seqüências peptídicas aleatórias (Figura 2). Esse sistema permite a seleção de uma variedade de peptídeos que marcam tecidos normais, câncer e outras doenças associadas a angiogênese. O método de *phage display* tem possibilitado a identificação de muitos receptores para esses peptídeos. Estudos complementares estão ajudando a caracterização funcional e ocorrência de anormalidades nos vasos sanguíneos durante a progressão tumoral (Zurita *et al.*, 2003).

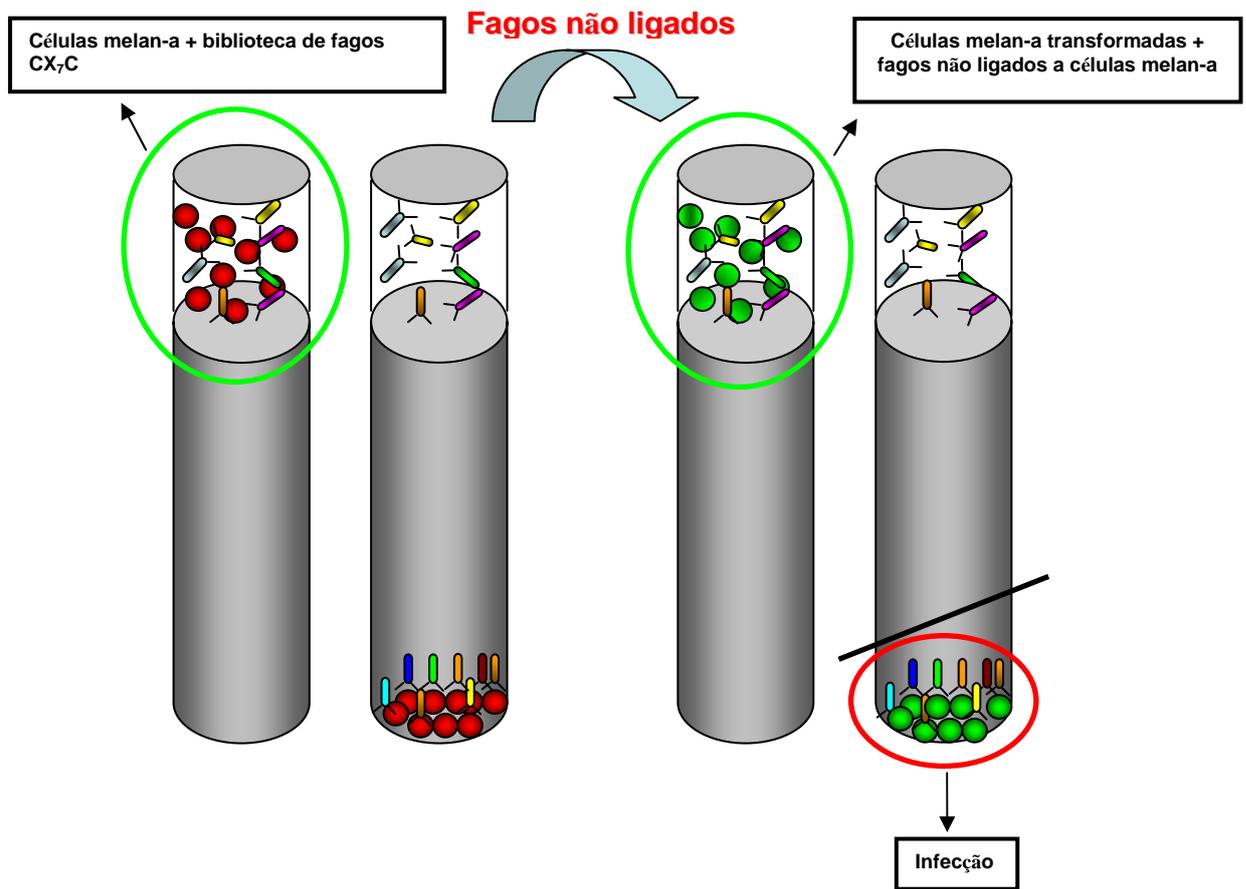


Figura 2. A metodologia de *phage display* foi utilizada para a identificação de moléculas diferencialmente expressas por células melan-a e melan-a transformadas. Representação esquemática da estratégia adotada para isolamento de fagos carregadores de peptídeos ligantes de moléculas expressas em células melan-a transformadas.

1.5 MODELOS ANIMAIS DE TRANSFORMAÇÃO

Modelos animais de carcinogênese começaram a ser desenvolvidos há um século, quando William Castle e Clarence Cook criaram o conceito de linhagens de animais isogênicos (Morse, 1978). Esses animais possuíam maior suscetibilidade para desenvolver cânceres espontâneos ou induzidos por carcinógenos. Mais tarde descobriu-se que a suscetibilidade dessas linhagens de camundongos em desenvolver tumores estava relacionada à presença de vírus no seu genoma (Jonkers e Berns, 2002). No entanto, o mecanismo genético de carcinogênese induzido pelos vírus só foi estabelecido com o desenvolvimento de sistemas *in vitro*, que permitiram que as células de mamíferos fossem estudadas isoladamente. Com o desenvolvimento de meios de crescimento seletivos e fatores de crescimento específicos para uma variedade de tipos celulares, foi possível estabelecer e propagar células *ex vivo*.

A infecção de células em cultura com os vírus tumorais induziu dramáticas alterações tanto morfológicas quanto na capacidade de proliferação. O termo transformação foi utilizado a partir de então para designar alterações de células em cultura *in vitro*, as quais seriam equivalentes àquelas observadas em tumores animais.

Dessa maneira, a identificação inicial de genes associados ao desenvolvimento de tumores só foi possível com advento de duas abordagens técnicas: (1) estabelecimento de culturas de células embrionárias de camundongos; (2) transformação dessas células com material genético vindo de tumores humanos, num primeiro momento, seguido de transfecção de genes candidatos a oncogenes ou genes supressores de tumor (Hahn and Weinberg, 2002). Desses estudos, foi possível identificar mais de uma centena de genes potencialmente envolvidos diretamente no processo de tumorigênese. Com a possibilidade de geração de animais geneticamente modificados, a participação de genes candidatos no desenvolvimento de tumores tem sido recapitulada em diversos ensaios, incluindo aqueles que exploram o cultivo de células embrionárias.

Operacionalmente, os genes transformantes freqüentemente estão associados ao desenvolvimento de uma segunda capacidade das células imortalizadas: o crescimento independente de ancoragem. Essa capacidade é operacionalmente definida como crescimento em ágar mole (*soft agar*), situação experimental onde as

células privadas de superfície aderente crescem em focos empilhando-se umas sobre as outras. Esses focos são chamados focos de transformação. Essa capacidade guarda boa correlação com capacidade de crescimento na forma de tumores em animais imunodeficientes. A transformação de células em cultura, portanto, provaram ser um modelo bastante eficiente para se estudar as etapas da carcinogênese.

1.6 LINFÓCITOS B-1

Os linfócitos B-1, subtipo de células B, foram inicialmente identificados como células B CD5⁺ que participam de processos auto-ímmunes em camundongos (Hayakawa *et al.*, 1983), com características similares às das células responsáveis pela Leucemia Linfocítica Crônica em humanos (Boumsell *et al.*, 1978). Essas células diferem das células B-2 convencionais por sua localização anatômica, expressão de marcadores de superfície e funcionalidade (Hayakawa *et al.*, 1985; Herzenberg *et al.*, 1986; Martin *et al.*, 2001).

Linfócitos B-1 representam somente 1-5% das células B totais em camundongos, mas são a principal população de células B nas cavidades peritoneal e pleural, podendo ser também encontradas no baço, linfonodos e intestinos (Kantor and Herzenberg, 1993). Fenotipicamente essas células expressam B220 (CD45R)^{lo}, IgM^{hi}, IgD^{lo}, CD9⁺, CD43⁺, CD11b, e podem ser divididas em pelo menos duas subpopulações, B-1a (CD5⁺) e B-1b (CD5⁻) (Berland and Wortis, 2002; Won and Kearney, 2002; Duan and Morel, 2006).

As diferenças funcionais entre os linfócitos B-1 e B-2 são numerosas e têm sido revisadas extensamente (Kantor and Herzenberg, 1993; Martin *et al.*, 2001; Berland and Wortis, 2002; Hardy, 2006). Células B-2 respondem eficientemente a antígenos protéicos e participam da resposta imune adaptativa por sofrer hipermutação somática dos genes das imunoglobulinas e maturação da afinidade do receptor. Em contraste, linfócitos B-1 respondem rapidamente a antígenos timo-independentes, razão pela qual têm sido reconhecidos como veículos da imunidade inata (Hardy, 1992; Herzenberg, 2000; Baumgarth *et al.*, 2005). Além disso, observações mostraram diferenças funcionais mesmo entre os subtipos de linfócitos B-1 (Alugupalli *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2005; Alugupalli and Gerstein, 2005; Hsu *et al.*, 2006). Linfócitos B-1a secretam IgM de forma espontânea, provendo a primeira barreira contra bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae*. Em

contraste, a produção de anticorpos por linfócitos B-1b é induzida e está envolvida na remoção final de patógenos e na proteção em longo prazo (Haas *et al.*, 2005).

Por outro lado, diferentemente das células B-2, que têm período de vida curto e são continuamente geradas por progenitores na medula óssea, os linfócitos B-1 são mantidos por proliferação homeostática ou auto-renovação, como mostraram os experimentos de transferência adotiva de linfócitos B-1 em animais imunodeficientes (Hayakawa *et al.*, 1985; Forster and Rajewsky, 1987). Em 1997, Karras e colaboradores demonstraram que essa propriedade de crescimento dos linfócitos B-1 é devida à ativação constitutiva da proteína *Stat3* (*Signal transducer and activator of transcription 3*), que substitui o sinal de proliferação mediado pela ligação BCR-antígeno (Berland and Wortis, 2002; Casola *et al.*, 2004). Adicionalmente, linfócitos B-1 também expressam níveis constitutivos de quinase regulada por sinais extracelulares (Wong *et al.*, 2002).

Linfócitos B-1 também produzem grandes quantidades de interleucina 10 (O'Garra *et al.*, 1992; Gieni *et al.*, 1997), uma citocina do tipo Th2, antiinflamatória, que participa da supressão de respostas pró-inflamatórias (Moore *et al.*, 1993). Os linfócitos B-1 utilizam essa citocina como fator autócrino de crescimento (O'Garra *et al.*, 1992) e, por essa razão, a eliminação de linfócitos B-1 induzida pelo tratamento com anticorpos anti-IL-10 é acompanhada por drástica diminuição dos títulos de imunoglobulinas séricas (Ishida *et al.*, 1992).

A participação dos linfócitos B-1 tem sido demonstrada em várias patologias, tanto em humanos como em camundongos (Aramaki *et al.*, 1998; Mohan *et al.*, 1998; Hayakawa *et al.*, 2000; Antsiferova *et al.*, 2005; Hardy, 2006; Duan and Morel, 2006). A expansão de linfócitos B-1 autorreativas foi associada ao desenvolvimento de doenças auto-imunes (Murakami *et al.*, 1992; Murakami and Honjo, 1995; Mohan *et al.*, 1998) e leucemias de células B (Chevallier *et al.*, 1998). Além disso, Minoprio e colaboradores (1993) demonstraram que na infecção chagásica experimental ocorre aumento significativo de linfócitos B-1 esplênicas na fase aguda da doença e ainda, camundongos *Xid*, geneticamente modificados e desprovidos de linfócitos B-1, resolvem com maior eficiência a infecção por esse protozoário. Resultados semelhantes foram obtidos também em infecções causadas por *Paracoccidioides brasiliensis* e por filárias linfáticas (Paciorkowski *et al.*, 2000; Marcelino França *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que essas células são capazes de migrar para focos inflamatórios inespecíficos induzidos

por corpo estranho, diferenciando-se em fagócitos mononucleares com características similares a macrófagos (Almeida *et al.*, 2001; Bogsan *et al.*, 2005). Outros trabalhos do nosso grupo, alguns deles em andamento, mostraram também a participação dos linfócitos B-1 na evolução da infecção causada por *P. brasiliensis* (Godoy *et al.*, 2003), no lupus eritematoso sistêmico murino (Brito *et al.*, 2007), na cicatrização (Oliveira *et al.*, em preparação), na formação de células gigantes (Bogsan *et al.*, 2005) e de granulomas (Vigna *et al.*, 2006).

Além do papel imuno-modulador dos linfócitos B-1 nas patologias descritas acima, resultados recentes do nosso grupo (Pérez *et al.*, 2008; Staquicini *et al.*, submetido) mostraram que o contato prévio de linfócitos B-1 com células de melanoma murino da linhagem B16 foi capaz de induzir aumento no potencial metastático dessas células tumorais, sugerindo assim, a participação dos linfócitos B-1 também na regulação de mecanismos que controlam metástases.

Pérez e colaboradores (2008) demonstraram que um dos mecanismos pelos quais linfócitos B-1 induziam aumento no potencial metastático nas células B16 envolvia interações célula/célula e aumento na ativação de *ERK* (*extracellular-signal regulated kinase*), via de sinalização intracelular cuja superexpressão tem sido amplamente descrita na progressão tumoral e metástases de vários tipos de câncer, entre eles o melanoma (D'Angelo *et al.*, 1995; Ilan *et al.*, 1998; Krueger *et al.*, 2001; Sahai *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2002; Satyamorthy *et al.*, 2003; Choo *et al.*, 2005).

A participação de células do sistema imune e fatores humorais no controle da formação de metástases têm sido exaustivamente investigados em melanoma. Evidências sugerem a eficácia da vacinação e da imunoterapia ativa enquanto a imunização com células dendríticas e peptídeos isolados de tumores parecem recrutar eficiente resposta antitumoral (Mendiratta *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002; Björkdahl *et al.*, 2000). No entanto, apesar de todos os esforços despendidos para o esclarecimento dos reais fatores imunológicos envolvidos na resposta ao câncer, a participação das células B-1 no crescimento e metastatização do melanoma e outras neoplasias ainda não foi completamente investigada.

1.7 CÉLULAS MELAN-A

Melan-a é uma linhagem de melanócitos pigmentados imortalizados, estabelecida de melanoblastos epidermais normais de embriões de camundongos C57BL. Essas células proliferam em condições semelhantes às aquelas requeridas pelos melanócitos e melanoblastos de camundongos normais não estabelecidos, como dependência de forbol miristato acetato (PMA) e pH extracelular baixo. Essas células não formam tumores em camundongos singênicos ou *nude*, mesmo quando inoculadas em quantidade elevada (2×10^7 células por animal), e retêm todas as características de melanócitos normais testadas, exceto pela resposta proliferativa à toxina da cólera na presença de PMA e pela senescência (Bennett *et al.*, 1987).

1.8 LINFÓCITOS B-1 E CÉLULAS MELAN-A

Há alguns anos, nosso laboratório dedicou-se ao desenvolvimento de modelos experimentais que visam melhor compreensão de aspectos fisiopatológicos das células B-1. Foram obtidos resultados que mostram que essas células transformam-se em fagócitos mononucleares distintos de macrófagos derivados de monócitos (Almeida *et al.*, 2001) e que participam da composição de células gigantes (Bogsan *et al.*, 2005). Mais ainda, demonstram a participação de células B-1 na formação de granulomas (Vigna *et al.*, 2006) e na evolução do lúpus eritematoso experimental (Brito *et al.*, 2007).

Visando caracterizar seu envolvimento em outros aspectos patológicos, testes *in vivo* foram realizados sobre sua possível interferência no desenvolvimento do melanoma experimental em camundongos. Os resultados indicam que tumores primários e metástases de melanoma podem estar diretamente relacionados à presença das células B-1. A influência direta dessas células no potencial metastático do melanoma foi obtida em modelo de co-cultivo *in vitro*. Foi demonstrada maior expressão de moléculas de adesão e síntese de proteases por células de melanoma após contato com linfócitos B-1 (Staquicini *et al.*, submetido).

Com o objetivo de estudar algumas interrelações de maneira direta, o modelo de estudo de transformação maligna de melanócitos murinos utilizado durante esse trabalho foi desenvolvido a partir de duas populações celulares distintas, células melan-a e linfócitos B-1, que após co-cultivo gerou uma terceira população celular: células melan-a transformadas. A utilização de células B-1 num modelo experimental

de melanoma murino foi descrita pela primeira vez em nosso laboratório (Staquicini *et al.*, submetido). Depleção de linfócitos por irradiação pode interferir no crescimento tumoral e estabelecimento de metástase experimental. Nós obtivemos evidências que populações de células B-1 podem modular o crescimento de células de melanoma. Além disso, interações entre ambas as células podem ser observadas após dois dias de co-cultivo. Células de melanoma previamente cultivadas na presença de células B-1 mostram alto potencial metastático quando comparado ao grupo controle num modelo *in vivo* (Pérez *et al.*, 2008). Essas células transformadas são capazes de formar tumores subcutâneos e metástases espontâneas no pulmão, constituindo importante ferramenta para o estudo de proteínas envolvidas em transformação e metástase (dados não publicados).

Considerando que a metodologia *BRASIL* e outras abordagens oferecidas pela técnica de *phage display* mostram-se bastante eficientes na busca de proteínas expressas em vários tipos celulares, incluindo células tumorais, o principal objetivo desse projeto foi caracterizar moléculas diferencialmente expressas em células melan-a (não tumorigênicas) e melan-a transformadas (tumorigênicas), que possam contribuir para elucidação dos processos envolvidos em transformação e progressão tumoral.

2. OBJETIVOS

GERAL

Caracterizar moléculas diferencialmente expressas em células melan-a e melan-a transformadas envolvidas no desenvolvimento de melanoma pela metodologia de *Phage display*.

ESPECÍFICOS

1. Selecionar fagos ligantes de moléculas diferencialmente expressas em células melan-a antes e após transformação.
2. Analisar os peptídeos selecionados.
3. Investigar possíveis atividades biológicas das moléculas identificadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES

As soluções aqui descritas foram preparadas com água bi-destilada ou com padrão Milli-Q.

3.1.1 Solução estoque de tampão fosfato-salina (PBS) 20x: NaCl 2,7378 M, KCl 0,053 M, Na₂HPO₄ 0,1301 M e K₂HPO₄ 0,0229 M. A solução estoque foi diluída 20 vezes para o uso (PBS 1x).

3.1.2 TBE 5x: 5,4 % de Tris-base, 2,75 % de ácido bórico, 1,86 % de EDTA (pH 8,0) (Sambrook *et al.*, 1989).

3.1.3 Suplemento para meio Terrific Broth (TB): 2,31 % de KH₂PO₄, 12,54 % de K₂HPO₄. Após dissolver por completo esta solução foi filtrada (filtro de 0,22 µm).

3.1.4 Suplemento para Meio Mínimo: este suplemento foi composto de quatro soluções, autoclavadas separadamente, e, após atingir temperatura ambiente, as três últimas soluções foram adicionadas a primeira e estocado à temperatura ambiente. Solução 1: 32,3 mL de 40 % (p/v) de glicose; solução 2: 25 mL de 0,4 M MgSO₄ (acondicionada em garrafa de plástico); solução 3: 3 mL de 0,1 M CaCl₂ (acondicionada em tubo de polipropileno) e solução 4: 10 mL de 1 % de tiamina (vitamina B1, HCl; acondicionada em tubo de polipropileno).

3.1.5 Tampão glicina: glicina 50 mM (Synth), NaCl 150 mM (Merck), pH 2,8.

3.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura descritos a seguir foram preparados com água bi-destilada e autoclavados a 120°C por 15 minutos. Para cultura de células de mamíferos os meios foram esterilizados por filtração positiva em filtros de 0,22 µm.

3.2.1 Meios para cultivo de células

3.2.1.1 Meio RPMI: RPMI 1640 (Sigma-Chemical) acrescido de ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfônico 10 mM (HEPES - Sigma), L-glutamina 2 mM (Sigma), bicarbonato de sódio 24 mM (Sigma) e 40 µg/mL de sulfato de gentamicina (Schering).

3.2.1.2 Meio RPMI suplementado (R-10): meio RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas), pH 7,2.

3.2.1.3 Meio RPMI suplementado (R-5): meio RPMI suplementado com 5 % de SFB, 200 nM de forbol miristato acetato (PMA), pH 6,9.

3.2.1.4 Meio RPMI suplementado (R-30): meio RPMI suplementado com 30 % de SFB, pH 7,2.

3.2.1.5 Meio de congelamento: SFB acrescido de 10 % de dimetil-sulfóxido (DMSO).

3.2.2 Meios para cultivo de bactérias

3.2.2.1 Meio Luria Bertani (LB): 1 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura e 1 % de NaCl, pH 7,0.

3.2.2.2 Meio LB kanamicina (kan)/tetraciclina (tet): meio LB acrescido de 40 µg/mL de tet e 100 µg/mL de kan. As soluções de antibióticos foram adicionadas em meio com ágar antes de solidificar (temperatura menor que 60°C). As placas prontas para uso foram mantidas a 4°C protegidas da luz.

3.2.2.3 Meio LB kan placas: meio LB acrescido de 1,5 % de ágar e depois de autoclavado adicionou-se 100 µg/mL de kan.

3.2.2.4 Meio TB: 1,2 % de triptona, 2,4 % de extrato de levedura, 0,4 % de glicerol.

3.2.2.5 TB suplementado (sup/kan): meio TB acrescido de 10 % de suplemento TB e 50 µg/mL de kan.

3.2.2.6 Meio Mínimo (MM): 0,9 % de KH₂PO₄ anidro, 1,66 % de Na₂HPO₄ anidro, 0,2 % NH₄Cl. O meio foi colocado em garrafas de vidro e autoclavado e, após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 0,88 µl/mL de suplemento para meio mínimo e 100 µg/mL de kan.

3.3 CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens de melanócitos murinos imortalizados, melan-a, foram cultivadas em R-5 e a linhagem melan-a transformada, obtidas em nosso laboratório após co-cultivo com células B-1 (Staquicini *et al.*, submetido), em meio R-10.

Todas as culturas celulares foram mantidas em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a 37°C.

3.4 CULTIVO DA BACTÉRIA *E. coli* K91kan

Uma colônia da cepa *E. coli* K91kan foi previamente semeada em LB kan caldo overnight, sob agitação rigorosa a 37°C. No dia seguinte, 100 µl da cultura foi transferida para 10 mL TB sup/kan e incubada a 37°C sob agitação rigorosa até a densidade ótica (DO 600nm) atingir 1,5 – 2,2.

3.5 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS

O congelamento das células foi realizado em meio contendo 90 % de soro fetal bovino e 10 % de DMSO. As células foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL (Costar Corp. Cambridge, MA) e centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio de congelamento. Cada alíquota de 1 mL contendo de 1 a 2 x 10⁶ células foi estocada por 24 horas a -70°C e posteriormente transferida para nitrogênio líquido.

O descongelamento das células foi efetuado em banho-maria a 37°C, transferindo-as imediatamente para tubos cônicos de 15 mL e diluindo gota a gota com 9 mL de meio R-10 ou R-5 de acordo com a linhagem celular. Foram então centrifugadas a 200 x g por 6 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 5 mL de meio completo e transferidas para garrafas de cultura de 25 cm². Foram depois cultivadas conforme descrito no item 3.3.

3.6 PHAGE DISPLAY

3.6.1 Biblioteca de *phage display*

A biblioteca de fagos utilizada neste projeto (CX₇C) consiste de 7 aminoácidos aleatórios dispostos entre duas cisteínas dando origem a um peptídeo cíclico. A biblioteca foi produzida nos laboratórios do Dr. Wadih Arap e Renata Pasqualini (UT-MD Anderson Cancer Center, USA) e Dr. Erkki Koivunen (Universidade de Helsinki, Finlândia). Utilizou-se o vetor fUSE5 e metodologia desenvolvida por George Smith (Smith and Scott, 1993) com algumas modificações para melhor eficiência e maior número de clones finais (Koivunen *et al.*, 1993; Koivunen *et al.*, 1999; Koivunen *et al.*, 1999).

3.6.2 BRASIL - seleção de fagos específicos para células melan-a transformadas

A seleção de fagos ligantes de células melan-a transformadas (tumorigênicas) foi realizada em três etapas: pré-seleção, eliminação de fagos ligantes de células melan-a e seleção de fagos ligantes em células melan-a transformadas (Figura 2).

3.6.2.1 Pré-seleção e seleção de fagos ligantes de células melan-a transformadas

Os fagos obtidos da pré-seleção foram transferidos para outro tubo contendo células melan-a transformadas (10^9 fagos para 10^6 células) em RPMI contendo 2 % de BSA. Nessa etapa foram removidos os fagos que carregavam peptídeos ligantes de células melan-a e recuperados os fagos que carregavam peptídeos ligantes de células melan-a transformadas. Após 1 hora de incubação em gelo, células e fagos não ligados foram separados por centrifugação ($10.000 \times g / 10\text{min}$) sobre óleo ftálico (dibutil-ftalato:ciclohexano [1:1 v/v]) (Giordano *et al.*, 2001). Após centrifugação, a fase aquosa - que permaneceu na parte superior do tubo e que contém os fagos não ligados - foi transferida para outro tubo contendo células melan-a transformadas. Seguiu-se incubação em gelo por 2 horas e nova centrifugação. Nessa etapa, o botão de células contendo fagos ligados foi removido e os fagos recuperados por infecção com *E. coli* K91kan, (Smith and Scott, 1993; Koivunen *et al.*, 1999) cultivados em meio Luria Bertani (LB) contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina e crescidos à 37°C por 18 horas. Os fagos secretados para o meio durante o cultivo foram precipitados utilizando solução a 20 % de polietilenoglicol 8000 (PEG) e 23,4 % de NaCl (Smith and Scott, 1993) e recuperados para sucessivos ciclos de seleção. Foram realizados três ciclos de seleção.

3.6.2.2 Larga Escala

Uma colônia da cepa *E. coli* K91kan foi previamente semeada em LB kan overnight, sob agitação rigorosa a 37°C. No dia seguinte, 100 μl desta cultura foi inoculada em 10 mL TB sup/kan, a 37°C sob agitação, até a densidade ótica (DO 600nm) atingir 1,5 – 2,2. Cerca de 200 μl desta cultura fresca foi infectada com botão celular contendo os fagos selecionados. Após uma hora a temperatura ambiente, todo este conteúdo foi transferido para tubo contendo 10 mL de meio LB

kan/tet, incubado sob agitação overnight a 37°C com o objetivo de aumentar a quantidade de fagos.

3.6.2.3 Precipitação dos fagos

Os fagos foram precipitados e concentrados utilizando polietilenoglicol 8000 e cloreto de sódio (Smith and Scott, 1993). Após a infecção das bactérias e incubação por 18 horas a 37°C, sob agitação, a cultura de bactérias infectadas pelos fagos foi centrifugada a 3600 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 15 % da solução de PEG/NaCl. Após 2 horas de incubação em gelo, este tubo foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O botão foi ressuscitado em 1 mL de PBS e novamente foi adicionado 15 % da solução de PEG/NaCl e incubado por 1 hora em gelo. Após o período de incubação, o tubo foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C e o botão foi novamente centrifugado por mais 10 minutos, garantindo que todo o PEG/NaCl havia sido removido do botão. Então, o precipitado de fagos foi ressuscitado em 50 µl de PBS estéril e centrifugado 10.000 x g por 5 minutos para remover todos os contaminantes bacterianos.

3.6.2.4 Titulação dos fagos

O título de fagos é indicado por unidades de transformação (TU). Para titulação, estes foram diluídos em LB 1000 vezes (1 µl em 1) e submetidos a uma diluição seriada 1/10 vezes iniciando do tubo 1. Foram utilizados 10 µl de cada uma das diluições para infectar 200 µl de cultura fresca de *E. coli* K91kan na fase log (DO 600nm), durante 40 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foram plaqueados 50 µl e 10 µl de cada diluição, em triplicata, em placas contendo LB agar-kan/tet mantidas a 37°C. No dia seguinte, as placas contendo entre 50-200 colônias foram selecionadas para a contagem. Multiplicando o número de colônias encontradas pela diluição obteve-se o título de fagos da solução estoque.

3.6.3 Seleção de clones, reação em cadeia da polimerase (PCR)

Ao final da fase de cada seleção, os fagos obtidos foram semeados em placas de LB-ágar-kan/tet. As colônias de *E. coli* infectadas foram selecionadas,

recuperadas aleatoriamente e cada colônia foi ressuspensa em 100 µL de PBS por poço da placa de 96 poços com fundo em U. A região do DNA contendo o inserto foi amplificada a partir de 2 µl da amostra por reação de PCR (Taq PCR Master Mix – Qiagen), utilizando-se oligonucleotídeos específicos (IDT) (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCTGATAAACCGATACAATT-3' e 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3') e termociclador (Personal Eppendorf) por 35 ciclos (desnaturação 94°C, 15 segundos; anelamento 60°C, 30 segundos e extensão 72°C por 1 minuto). Os produtos de PCR foram seqüenciados, analisados e traduzidos no UT-MD Anderson Cancer Center (Houston, USA) e Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer (São Paulo, Brasil).

3.6.4 Sequenciamento do inserto para determinação do peptídeo apresentado pelo fago

O método utilizado para o sequenciamento dos produtos de PCR foi o automático, realizado no aparelho ABI Prism®3100 Genetic Analyzer com o kit comercial Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems).

Para reação de seqüência utilizou-se 0,5 µl do produto de PCR, 1,6 pmol do oligonucleotídeo iniciador específico (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCTGATAAACCGATACAATT-3'), 1,5 µl do Big Dye Mix, 1 µl de tampão de sequenciamento (5 vezes) e completou-se o volume para 10 µl com água ultrapura. O programa de termociclagem utilizado foi de 25 ciclos sendo, desnaturação 96°C, 10 segundos, anelamento 50°C por 5 segundos e extensão 60°C por 4 minutos.

O DNA foi precipitado (15 minutos a 25°C) pela adição de 40 µL de etanol 80 % (Merck) e após centrifugação (1 hora, 2.500 x g, 25°C) o material foi lavado com 150 µL de etanol 70 % (Merck) e em seguida centrifugado por 30 minutos, 2.500 x g, 25°C. Antes de serem levadas ao seqüenciador as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystem), desnaturadas a 90°C, por 2 a 5 minutos e imediatamente colocadas em gelo por alguns minutos.

3.6.5 Análise dos peptídeos selecionados

Os peptídeos traduzidos a partir das seqüências dos insertos dos fagos obtidos nas etapas de seleção foram analisados com relação a diversos critérios de distribuição, repetição e similaridade entre si ou com proteínas conhecidas em banco

de dados. Uma análise importante é a distribuição de tri ou tetra peptídeos dentro da população de peptídeos identificados. A comparação entre a distribuição dessas seqüências pode fornecer informações com relação à distribuição e enriquecimento dos peptídeos, auxiliando na seleção dos melhores candidatos a serem posteriormente investigados. Essa análise pode ser ainda associada ao alinhamento das seqüências obtidas em busca de peptídeos homólogos (com características semelhantes). Os peptídeos selecionados foram analisados quanto ao seu enriquecimento de motivos pelo programa Clustal W, que realiza o alinhamento e organização dos peptídeos por motivos iguais ou semelhantes. Este programa utiliza como parâmetro aminoácidos semelhantes por carga, agrupando motivos hidrofóbicos, hidrofílicos e anfipáticos.

Após a triagem e seleção dos melhores candidatos, a análise comparativa com proteínas conhecidas em banco de dados (*National Center for Biotechnology Information [NCBI] BLAST*) auxilia na identificação do par ligante receptor. Os clones contendo as seqüências mais promissoras foram investigados em maior detalhe. Os peptídeos que apresentaram similaridade significativa com proteínas encontradas em bancos de dados foram validados por ensaio de ligação.

3.6.6 Ensaio de ligação

Para validar a interação entre possíveis pares peptídeo-receptor foram realizados ensaios de ligação em células utilizadas nos processos de seleção inicial. Nesse ensaio, 10^9 TU (*transforming units*) dos fagos a serem testados ou do fago controle (Fd-tet, sem inserto de peptídeo) foram incubados com 10^6 células melan-a ou células melan-a transformadas, coletadas por raspagem das garrafas de cultura (25cm), em RPMI contendo 2 % de BSA (USB), por 2 horas em gelo. Fagos não ligados foram separados por centrifugação sob fase orgânica (*BRASIL*) e os fagos ligados às células foram recuperados por infecção de *E. coli* K91kan. Diluições em série foram plaqueadas em meio LB-ágar-kan/tet para quantificação do número de fagos aderidos as células por contagem de colônias de bactéria após 16 horas de incubação a 37°C.

3.6.7 Ensaio de internalização

A análise da especificidade de ligação foi também realizada por ensaio de imunofluorescência. Para tanto, 10^5 células de melan-a e melan-a transformadas foram cultivadas por 18 horas em lamínulas de vidro contidas em placa de 24 poços, com R-10. Após esse período, sítios inespecíficos foram bloqueados com RPMI contendo 30 % de SFB (soro fetal bovino) por 1 hora a 37°C. As células foram então incubadas com 10^9 TU dos fagos em estudo por 12 horas a 37°C. Após sucessivas lavagens com tampão glicina e posteriormente PBS, células e fagos ligados foram fixados com PBS contendo 4 % de paraformaldeído por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas com PBS. Posteriormente as células foram permeabilizadas com 0,2 % de Triton X-100 por 5 minutos, lavadas com PBS e bloqueadas com PBS contendo 1 % de BSA (USB) por 2 horas a temperatura ambiente.

As amostras foram então submetidas à incubação com anticorpo primário policlonal antibacteriófago (SIGMA) por 2 horas à temperatura ambiente e lavadas 5 vezes com PBS contendo 1 % de BSA (USB). As células foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 488 (1:500) e fixadas com PBS contendo 4 % de paraformaldeído. A detecção de imagens foi feita por microscópio confocal (LSM510, Carl Zeiss).

3.7 RT-PCR PARA DETECÇÃO DE mRNA ESPECÍFICOS PARA PERLECAM, SINDECAM-4 E VERSICAM

3.7.1 Extração de RNA total

O RNA total das linhagens melan-a e melan-a transformadas foi extraído por Trizol® (Invitrogen), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Para extração, as células aderidas foram cultivadas até atingirem subconfluência, lavadas em PBS, removidas da placa de cultura com solução de tripsina, lavadas em meio R-10 e mais uma vez em PBS. Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas e homogeneizadas em 0,5 mL de Trizol®. Para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, as amostras homogeneizadas foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 100 µl de clorofórmio, os tubos agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g, durante 15 minutos, a

4°C, separando a solução em três fases distintas – a fase superior aquosa, contendo o RNA, foi transferida para tubos novos. O RNA foi precipitado com 250 µl de isopropanol durante 10 minutos à temperatura ambiente, e em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75 %, e centrifugado a 7500 x g, durante 5 minutos, a 4°C. Os tubos ficaram abertos à temperatura ambiente até que todo o etanol evaporasse. O RNA foi então ressuspensionado em água MilliQ tratada com DEPC estéril (água DEPC) e imediatamente congelado a - 80°C.

Para a quantificação do RNA extraído, 5 µl da suspensão foram diluídos em 1 mL de água destilada e a concentração determinada em espectrofotômetro pela leitura da densidade óptica (DO) em comprimento de onda de 260 nm, obedecendo a proporção de 40 µg de RNA/ por absorvância de 1 (Sambrook *et al.*, 1989). Também foram efetuadas medidas a 280 nm para avaliar a pureza do RNA. A relação dos valores obtidos a 260 e 280 nm (razão 260/280) deveria estar em torno de 1,9 para que o material fosse considerado puro o bastante para análise. Caso este valor não fosse atingido, o material era descartado e procedia-se nova extração de RNA.

A integridade do RNA total extraído das diferentes linhagens celulares foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, preparado em tampão fosfato de sódio 10 mM, contendo 16 % de formaldeído. Para 50 mL de gel, 0,75 g de agarose foi acrescentado a 41,5 mL de água DEPC e 0,5 de tampão fosfato 1 M pH 7,5. Esta solução foi aquecida até que toda a agarose se dissolvesse. Após acrescentar 8 mL de formaldeído, a solução foi colocada no suporte e mantida a temperatura ambiente durante 1 hora. Utilizou-se 5 µg de RNA total de cada amostra, adicionados a 3 vezes o volume do RNA de tampão de amostra e 1 µl de brometo de etídio 1 mg/mL. As amostras foram desnaturadas a 65°C por 5 minutos, esfriadas em gelo e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada em tampão fosfato de sódio 0,01 M a 60 volts por 2 horas. A cada 20 minutos o tampão era circulado para equilibrar o pH. O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada.

3.7.2 Síntese da fita de DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para excluir a possibilidade de contaminação por DNA genômico, 4 µg de RNA total foram tratados com a enzima DNase I, Amp Grade (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O volume da solução de RNA foi ajustado para 21 µl com água DEPC. Foram acrescentadas 1U da enzima DNase I e 20U do inibidor de ribonuclease, RNaseOut (Invitrogen) em uma solução contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi inativada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM (pH 8,0), seguida de incubação a 65°C por 10 minutos.

Aproximadamente 1 µg do RNA total tratado com DNase I (6,25 µl) foi incubado a 65°C por 5 minutos em solução contendo 500 ng de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) e 1,5 mM dNTP Mix em um volume de 6,5 µl, e imediatamente em gelo por 2 minutos. Após 2 minutos foram acrescentados 7 µl de uma solução contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT, 40U de Rnase Out (Invitrogen) e 200U da transcriptase reversa Superscript™ III (Invitrogen) e a reação realizada à temperatura de 25°C por 5 minutos, seguidos de 60 minutos a 50°C e mais 60 minutos a 55°C, finalizando com 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram estocados a -20°C.

Para a verificação da síntese e integridade da primeira fita do cDNA, o produto sintetizado por RT-PCR foi amplificado com oligonucleotídeos específicos para o gene da enzima gliceraldeído-3'-fosfato desidrogenase (GAPDH). Nesta reação adicionou-se 1 µL do cDNA sintetizado, tampão contendo 75 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 20 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,36 mM de dNTP Mix (0,36 mM de cada nucleotídeo), 0,36 mM de cada oligonucleotídeo (GAPDH Forward e GAPDH Reverse), e 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas). A reação foi realizada com uma desnaturação a 94°C por 5 minutos; seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão de 72°C por 10 minutos. As amostras de RNA total, antes e depois de serem tratadas com DNase I, também foram submetidas a esta reação para descartar a hipótese da amplificação do gene ser decorrente de uma contaminação por DNA genômico. Este controle sempre era feito quando se utilizava um cDNA pela primeira vez e quando nova alíquota do mesmo era feita a partir do estoque. Além deste, em todas as

PCRs foram realizadas reações sem a adição de cDNA para garantir que os reagentes utilizados estavam livres de contaminação.

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1 % preparado em tampão TBE. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts por 45 minutos em tampão TBE. A visualização do gel foi realizada em transluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada.

3.7.3 RT-PCR semiquantitativo

Diversas diluições foram utilizadas para a amplificação do gene de perlecam, sindecam-4, versicam e GAPDH (controle da reação). As reações foram realizadas em volume final de 25 μ L, utilizando-se 1 μ L de cDNA, tampão contendo 75 mM Tris-HCl (pH 9,0), 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,36 mM dNTP Mix, 0,36 μ M de cada oligonucleotídeo: perlecam (forward: 5'-GCCCGTGCACGCTGAGATTGA-3'; reverse: 5'-GGGGCAGACCCTGGATCTAAG-3'), sindecam-4 (forward: 5'-TGCTGCTCCTCGGAGGCTTC-3'; reverse: 5'-CCTTGGGCTCTGAGGGGACA-3'), versicam (forward:5'-CAAACCCATGCC TCAACGGAGG-3'; reverse:5'-CCTTCAGCAGCATCCCATGTGCGT-3') e GAPDH (forward: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGC TGTA-3') e 1 U de DNA polimerase. Para análise semiquantitativa da expressão de perlecam, sindecam-4 e versicam foram realizadas três reações para cada amostra, utilizando cDNA em diferentes diluições. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 %. O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada.

A intensidade das bandas foi quantificada através do programa ImageJ 1.38b (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os resultados foram normalizados pela relação dos valores obtidos na amplificação dos dois genes (razão da expressão de perlecam/GAPDH, sindecam-4/GAPDH e versicam/GAPDH).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística foi realizada pelo Student's t-test.

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM CÉLULAS MELAN-A E MELAN-A TRANSFORMADAS

Com o objetivo de identificar modificações na expressão de moléculas em células melan-a após contato com linfócitos B-1 (melan-a transformadas) - potencialmente envolvidas na interação entre células e nas mudanças fenotípicas observadas no melanoma, foi adotada a metodologia de *phage display* de peptídeos.

O método *BRASIL* (*Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands* - Giordano *et al.*, 2001), permite que proteínas diferencialmente expressas em nosso sistema celular sejam identificadas, além de prever os possíveis receptores presentes em células melan-a transformadas. Na Figura 2, foram esquematicamente representadas as principais etapas adotadas para a seleção de fagos carregadores de peptídeos que se ligam especificamente a células melan-a transformadas. Resumidamente, uma biblioteca de bacteriófagos que expressam peptídeos compostos de 7 aminoácidos aleatórios flanqueados por duas cisteínas (CX₇C) foi previamente incubada com células melan-a, a fim de eliminar os fagos ligantes dessas células. Nessa etapa, bacteriófagos ligados a células melan-a foram eliminados por centrifugação em fase orgânica. Bacteriófagos remanescentes na fase aquosa foram recuperados e incubados com células melan-a transformadas. Nessa segunda etapa foram recuperados os bacteriófagos ligados a essas células, enriquecidos de peptídeos específicos.

Após 3 etapas de seleção, observa-se enriquecimento expressivo de fagos específicos para células melan-a transformadas (Figura 3).

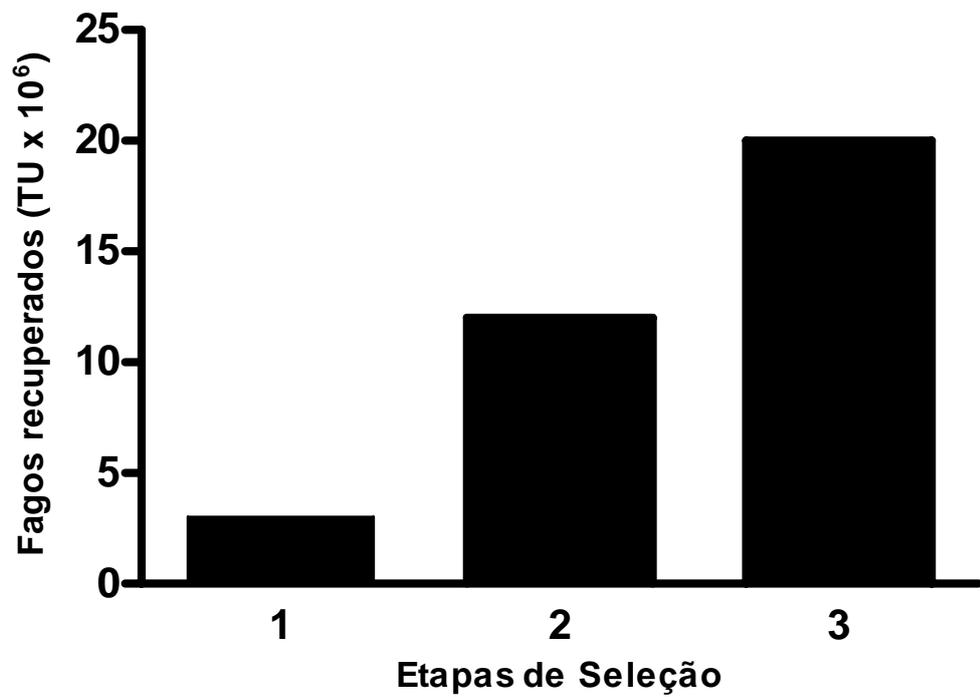


Figura 3: Seleção de fagos específicos para células melan-a transformadas. A biblioteca de fagos CX₇C foi previamente incubada com células melan-a e os fagos não ligados foram recuperados e então incubados com células melan-a transformadas. Fagos ligados a células transformadas foram recuperados por infecção utilizando a bactéria *E. coli* K91kan, purificados e submetidos ao mesmo procedimento, sendo somadas três etapas de seleção. Observa-se enriquecimento de fagos específicos para células melan-a transformadas a cada etapa de seleção.

4.2 SELEÇÃO DE FAGOS, PCR E SEQUENCIAMENTO DO INSERTO PARA DETERMINAÇÃO DO PEPTÍDEO APRESENTADO PELO FAGO

Ao final da fase de seleção dos fagos ligantes de células melan-a transformadas, colônias de *E. coli* infectadas com fagos, foram obtidas por seleção aleatória. A região do DNA contendo o inserto foi amplificada pela reação em cadeia polimerase (PCR). Os produtos de PCR foram seqüenciados, analisados e traduzidos no MD Anderson Cancer Center.

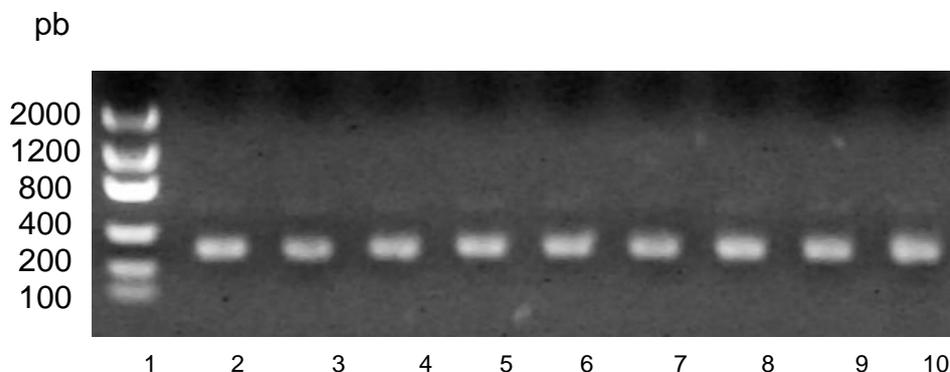


Figura 4: Análise eletroforética em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. Coluna 1 - marcador de massa molecular *low DNA mass ladder* (Invitrogen). Colunas 2 a 10, referem-se a amostras aleatórias dos insertos dos fagos selecionados (em torno de 300 pb).

4.3 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS

Os fagos obtidos nas etapas de seleção anteriores foram analisados com relação a diversos critérios de distribuição, repetição e similaridade entre si ou com proteínas conhecidas em banco de dados. Uma análise importante é a distribuição de tri ou tetra peptídeos dentro da população de peptídeos identificados. A comparação entre a distribuição dessas seqüências fornece informações com relação à distribuição e enriquecimento dos peptídeos, auxiliando na seleção dos melhores candidatos a serem investigados. Essa análise foi ainda associada ao alinhamento das seqüências obtidas em busca de peptídeos homólogos. Após a triagem e seleção dos melhores candidatos, foi realizada análise comparativa com proteínas conhecidas em banco de dados (BLAST – *basic local alignment search*

tool) auxiliando na identificação do receptor. Os fagos contendo as seqüências mais promissoras foram investigados em maior detalhe. Os peptídeos que apresentaram similaridade significativa com proteínas encontradas em bancos de dados foram validados por ensaio de ligação. Foram obtidos vários motivos de repetição, dentre esses, os três primeiros apresentados na tabela 3, os de escolha.

Tabela 3: Seqüências de maior freqüência encontradas nas etapas 2 e 3 de seleção.

Seqüências	2º Ciclo	3º Ciclo
GVV	0 (0.0 %)	5 (6.17 %)
GAR	1 (1.16 %)	4 (4.94 %)
AAL	0 (0.0 %)	3 (3.70 %)
AGG	4	3 (3.70 %)
ARS	1	3 (3.70 %)
GAI	0	3 (3.70 %)
GGR	3	3 (3.70 %)
GGV	2	3 (3.70 %)
GLR	1	3 (3.70 %)

4.4 ANÁLISE DA AFINIDADE E ESPECIFICIDADE DOS FAGOS SELECIONADOS

Ensaio de ligação com os fagos carregando as seqüências de maior repetição revelou que grande parte dos fagos selecionados se liga com maior freqüência a células melan-a transformadas (Figura 5).

A análise por *BLAST* (*basic local alignment search tool*) das seqüências de repetição de maior freqüência revelou uma série de proteínas possivelmente envolvidas na caracterização diferencial de moléculas presentes em células melan-a e melan-a transformadas. Foi selecionada para posterior análise a sequência peptídica CRAGQVRSC que apresenta homologia com perlecam, molécula expressa por células de melanoma altamente metastáticas. Além da análise de proteínas em bancos de dados, consideramos a freqüência de repetição das seqüências e proteínas de interesse para o estudo.

Análises demonstraram que foram obtidos vários peptídeos com homologia ao perlecam, um proteoglicano heparam sulfato, indicando participação efetiva dessa proteína em nosso sistema. Seis fagos carregadores de diferentes seqüências peptídicas, localizadas em diferentes domínios da proteína, foram testados sendo que 3 (F5, F6 e D4) apresentaram maior ligação a células melan-a e os outros (F2, D5 e B2) apresentaram maior ligação a células melan-a transformadas.

A especificidade de interação dos fagos selecionados foi testada considerando que o receptor/fago por ele mimetizado poderia ser uma molécula de perlecam heparam sulfato. Esse proteoglicano caracteriza-se por sua capacidade de promover aumento metastático, uma vez que está envolvido no controle do crescimento celular e estruturação de matriz (Adatia *et al.*, 1997). A capacidade de internalização dos fagos pelo receptor de células melan-a transformadas demonstra maior afinidade e especificidade pela seqüência peptídica expressa pelo fago D5. Resultados com o fago F2 também são apresentados. O mesmo ensaio foi realizado utilizando células melan-a, e não houve internalização dos fagos selecionados pelo receptor destas células (dados não mostrados). Essas análises foram realizadas por imunofluorescência (Figura 6).

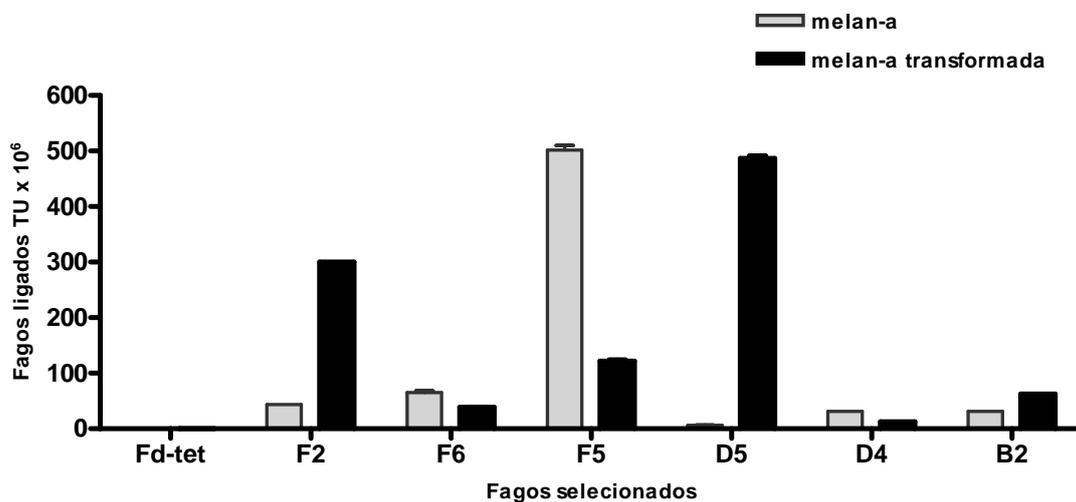


Figura 5: Ensaio de ligação. Fagos ligados às células melan-a e melan-a transformadas foram comparados. Fago sem inserto de peptídeo (Fd-tet) foi utilizado como controle. O ensaio de ligação foi realizado três vezes com resultados similares. F2, F6, F5, D5, D4, B2: fagos selecionados.

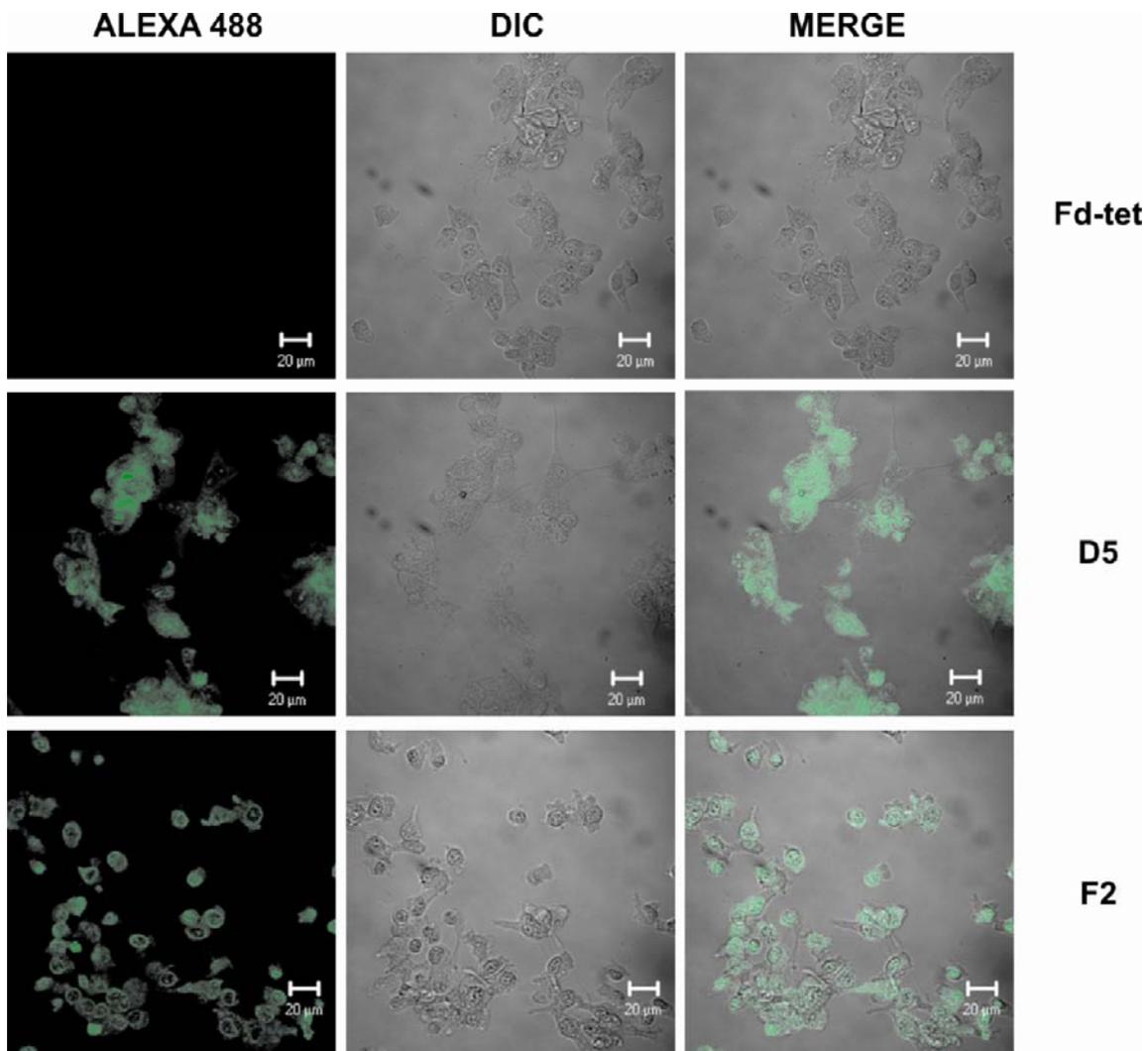


Figura 6: Ensaio de internalização. Células melan-a transformadas foram incubadas com 10^9 TU de cada fago selecionado por 12 horas. Após incubação, os fagos internalizados foram detectados com anticorpo primário policlonal anti-bacteriófago e com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 488. Coluna à esquerda: fagos internalizados fluorescentes. Coluna central: indica imagens de contraste de fase (DIC). À direita, imagens sobrepostas. Fd-tet: fagos sem inserto foram usados como controle negativo; D5: fago D5 internalizado por células melan-a transformadas; F2: fago F2 internalizado por células melan-a transformadas. Aumento 400X.

4.5 EXPRESSÃO DE PROTEOGLICANOS POR CÉLULAS MELAN-A E MELAN-A TRANSFORMADAS

A heterogeneidade de proteoglicanos (PG)s contribui para sua diversidade funcional. Muitas funções dependem da sua habilidade de ligar e modular a atividade de componentes da matriz extracelular (MEC). A capacidade de PGs se ligarem e modularem com outras moléculas, como fatores de crescimento, é determinada pelas cadeias de glicosaminoglicanos (GAG). Tumorigênese está associada, entre outros fatores, às mudanças na síntese de PGs. PGs de heparan sulfato (HS) estão envolvidos em diversos aspectos da biologia do câncer incluindo progressão tumoral, angiogênese e metástase, podendo tanto promover como suprimir atividades tumorais (Fjeldstad *et al.*, 2005).

Alterações na expressão ou função de moléculas como integrinas, CD44, caderinas e proteoglicanos de superfície celular têm sido documentadas na progressão de melanoma primário (Bogenrieder and Herlyn, 2002). Uma vez que diversos proteoglicanos estão envolvidos em mecanismos moleculares de disseminação tumoral e para melhor caracterizar as alterações que ocorrem durante a transformação do melanócito, analisamos a expressão do *core* protéico de três proteoglicanos (perlecan, versican e sindecam) por RT-PCR semiquantitativo (Figura 7).

O aumento da expressão de perlecan por células melan-a transformadas foi investigado considerando que o ligante mimetizado pelo fago selecionado poderia estar envolvido no processo tumoral. Como demonstrado na Figura 7A, células melan-a transformadas têm expressão aumentada de perlecan comparado a células melan-a. Outras moléculas envolvidas foram estudadas. Perlecan e versican (Figura 7A e 7B), mas não sindecam-4 (Figura 7C) apresentaram a expressão do *core* protéico alterado.

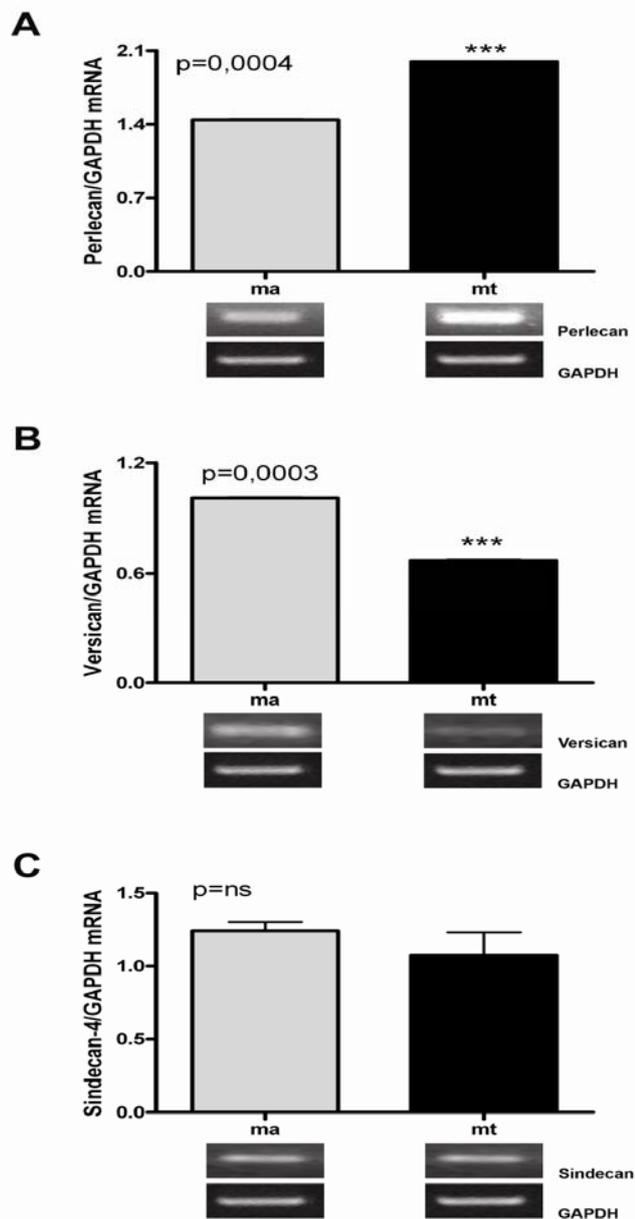


Figura 7: Expressão de perlecan, versican e syndecan-4. cDNA foi obtido por RT e após diluição amplificado por PCR semiquantitativo para perlecan (A), versican (B) e syndecan-4 (C), com os produtos resultantes visualizados em gel de agarose. A intensidade de marcação com brometo de etídio foi analisada para cada gene e por um controle interno (GAPDH). Números no eixo y representam a razão entre a expressão do core protéico/GAPDH para cada tipo celular, determinado por quatro diferentes diluições de cDNA. Produtos amplificados da diluição inicial de cDNA foram descritos abaixo de cada painel para perlecan (1:2,5), versican (1:2,5) e syndecan-4 (1:5) e GAPDH (mesma diluição que o respectivo core protéico). ma, melan-a; mt, melan-a transformada. Student's t test foi usado para análise estatística.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos significativos avanços obtidos nos últimos anos em estudos experimentais e clínicos, a biologia do melanoma permanece pouco esclarecida. Cada nova informação, portanto, representa importante passo para a elucidação e tratamento da doença. Crescentes esforços são concentrados na identificação de marcadores tumorais importantes para diagnóstico e desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos.

O progresso em biologia do melanoma foi feito em diversas áreas, tanto pelo estudo de oncogenes e genes de supressão tumoral quanto à matriz extracelular (Herlyn *et al.*, 2002). Admite-se que durante a progressão tumoral, células adquirem aumento na capacidade de migração e proliferação e regridem a um fenótipo menos diferenciado. Em melanoma, esse processo é caracterizado pela expressão ou repressão, em diferentes períodos, de diversas moléculas (Domenzain *et al.*, 2003).

Com o avanço das técnicas em biologia molecular veio a identificação de marcadores de melanoma, os quais podem ser usados clinicamente para a otimização de diagnóstico e detecção de metástases. Muitos marcadores para melanoma têm sido identificados, permitindo diferenciar células tumorais de baixo e alto potencial metastático (Bottoni *et al.*, 2003).

George Smith foi o primeiro a demonstrar que fagos filamentosos poderiam ser utilizados para apresentar peptídeos antigênicos fundidos à proteína pIII do capsídeo viral (Smith, 1985). Fagos que apresentam peptídeos poderiam ser imunocapturados pelo respectivo anti-soro dirigido contra o antígeno contendo os peptídeos presentes na superfície do capsídeo viral. Assim surgiu o conceito de “*Peptide Phage Display*”, inicialmente empregado para caracterização de epítopos de anticorpos monoclonais e policlonais (Smith, 1985). Desde então, bibliotecas de *phage display* têm sido amplamente utilizadas na identificação de peptídeos ligantes a qualquer alvo biológico, tais como anticorpos, receptores, enzimas, moléculas de adesão, entre outras.

Phage display de peptídeos consiste em uma coleção de bilhões de peptídeos apresentados na superfície de bacteriófagos que podem ser utilizados para identificar ligantes a qualquer molécula de interesse. Essa coleção de peptídeos pode ainda ser utilizada na busca de moléculas diferencialmente expressas, como por exemplo, sub-linhagens celulares com diferentes potenciais metastáticos

originárias de uma mesma linhagem celular. Além de permitir a identificação de novos alvos terapêuticos, essa metodologia fornece ainda informações importantes relativas à atividade biológica dos alvos identificados e seus receptores. Os dados obtidos podem ser rapidamente levados à clínica, como alvos terapêuticos (Mintz *et al.*, 2003), agentes carregadores de drogas (Arap *et al.*, 1998), vetores para terapia gênica (Trepel *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2003) entre outras.

Dentre as metodologias que poderiam ser utilizadas em nosso sistema, *phage display* de peptídeos destaca-se por permitir não apenas a identificação de proteínas, mas também por fornecer informações importantes referentes à sua atividade biológica. Várias são as possíveis aplicações dessa metodologia como, por exemplo, peptídeos identificados apresentarem atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo. No caso de enzimas, o peptídeo imita o substrato e liga-se ao sítio alvo inibindo sua atividade (Koivunen *et al.*, 1999; Cloutier *et al.*, 2002), ou no caso de receptores de superfície, o peptídeo se assemelha a uma proteína ligante do receptor competindo por sua ligação (Koivunen *et al.*, 1993).

A seleção de peptídeos pode ser feita de diversas formas com resultados finais significativamente distintos. *Biopanning* com moléculas imobilizadas em plástico ou partículas inertes é recomendado para anticorpos, uma vez que esses podem ser purificados de soro e facilmente manipulados sem perda significativa de atividade (Mintz *et al.*, 2003). Outro processo de seleção amplamente utilizado é aquele realizado diretamente na superfície da célula. Nesse sentido, foi desenvolvido um método que consiste na separação de células e fagos utilizando uma única centrifugação. Esse processo foi chamado de *BRASIL* (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*) desenvolvido por Giordano e colaboradores (Giordano *et al.*, 2001), que demonstraram que células contendo fagos ligados à sua superfície podem ser separadas de fagos não ligados através de passagem por fase orgânica enquanto os não ligados permanecem na fase aquosa. Os peptídeos identificados por essa metodologia têm sido empregados no desenho racional de fármacos, terapia direcionada, terapias gênicas, produção de vacina, melhores métodos de diagnóstico, entre outras aplicações.

A identificação de moléculas que poderiam participar de alterações fenotípicas entre as células, induzidas após contato com linfócitos B-1, foi abordada pela metodologia de *phage display*. Em nosso sistema, a seleção de peptídeos

ligantes de moléculas expressas preferencialmente na linhagem de melanoma após contato com linfócitos B-1, melan-a transformadas, foi feita em duas etapas, utilizando a metodologia *BRASIL* (Giordano *et al.*, 2001). Primeiramente, células melan-a foram utilizadas em uma etapa de pré-seleção de fagos ligantes dessa linhagem celular. Fagos ligados a células melan-a foram descartados e aqueles não ligados foram utilizados em uma segunda etapa de seleção. Na segunda fase da seleção, fagos que não se ligaram à primeira linhagem celular foram incubados com células melan-a transformadas, sendo nesse caso recuperados apenas aqueles ligados às células. Foram obtidos por essa metodologia fagos carregadores de peptídeos ligantes de proteínas superexpressas ou exclusivamente expressas por células melan-a transformadas (Figura 3).

Nesse sentido, a busca por moléculas responsáveis pelo potencial metastático de células melan-a transformadas e possivelmente envolvidas entre células e matriz extracelular, nos levou a várias moléculas prontamente identificadas, estando entre elas o proteoglicano heparam sulfato - perlecan, intensamente investigada por vários grupos de pesquisadores em todo o mundo e considerada como marcador de progressão tumoral (Cohen *et al.*, 1994; Iozzo *et al.*, 1994). Como demonstrado posteriormente, células melan-a transformadas apresentam aumento na expressão de perlecan, verificado pelo método de RT-PCR semiquantitativo (Figura 7A).

Os proteoglicanos heparam sulfato são fatores-chaves em muitas interações entre as células e seu ambiente. Durante a disseminação de células tumorais essa relação é modulada, aumentando a desorganização da membrana basal. A presença de proteoglicanos heparam sulfato na membrana basal indica que cadeias glicosaminoglicanas sulfatadas são degradadas mais rapidamente por células com alto potencial metastático, em um processo mediado por endoglucuronidase ou heparanase, reforçando a importância funcional das cadeias de heparam sulfato na invasão tumoral.

O core protéico de perlecan é capaz de interagir com componentes da matriz extracelular influenciando o comportamento na adesão celular. Perlecan parece estar diretamente envolvido no crescimento e invasão de células tumorais *in vivo* pela sua habilidade em capturar e armazenar fatores angiogênicos, como bFGF. Estudos de proteoglicanos em células de melanoma humano têm mostrado que a superexpressão de proteoglicanos heparam sulfato é um marcador de fenótipo mais

agressivo. Mais ainda, perlecam isolado de tumores EHS estimulam invasão de células de melanoma em ensaio *in vitro*. O crescimento de células endoteliais malignas, mas não de células transformadas, em membranas basais reconstituídas é severamente suprimida quando perlecam é degradado (Iozzo *et al.*, 1994).

Baseado nesses dados, perlecam foi rapidamente considerado como alvo para nosso estudo. Há cada vez mais evidências para o envolvimento de perlecam em progressão e vascularização tumoral (Iozzo, 1998; Iozzo *et al.*, 1996). Um tema comum emergente de evidências experimentais é que o comportamento agressivo coincide com a síntese e secreção desse potente estimulante angiogênico (Aviezer *et al.*, 1994; Aviezer *et al.*, 1997). Além disso, perlecam é sintetizado tanto por células do estroma, quanto tumorigênicas (Sharma *et al.*, 1998). Assim, o crescimento de células neoplásicas e estromais poderia se beneficiar da alta e constante produção de suplementos nas cadeias de heparan sulfato e *motifs* de adesão à célula no *core* protéico de perlecam (Benitz *et al.*, 1990), como também facilitando a ligação de FGF-2 e estímulo mitogênico dessas células (Forsten *et al.*, 1997).

A expressão do gene de perlecam confere não somente vantagens de crescimento, mas é um componente essencial para processos altamente complexos e multifatoriais que levam à angiogênese. Não surpreende que agentes como fator de necrose tumoral α e fator de necrose tumoral β , ambos antiangiogênicos, são também potentes inibidores da expressão gênica de perlecam. Conseqüentemente, terapias focadas em eliminar a expressão de perlecam podem ser benéficas e melhorar potencialmente o tratamento de câncer (Sharma *et al.*, 1998).

PGs também estão envolvidos na transformação neoplásica de diversos tipos celulares. HS e CS têm sido particularmente implicados na formação tumoral, incluindo melanoma, devido a essa capacidade de ligar e modular um grande número de moléculas que são importantes para o desenvolvimento tumoral, como fator de crescimento básico de fibroblasto e fator de crescimento endotelial vascular (Sasisekharan *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002).

A expressão do *core* protéico de outros PGs foram determinadas por RT-PCR semiquantitativo. Como mostra a Figura 7, os níveis de perlecam aumentam após a transformação, os níveis de versicam diminuem e os níveis de sindecam-4 não se alteram. Dentre os PGs de matriz extracelular, perlecam parece promover a progressão tumoral (Sharma *et al.*, 1998, Timar *et al.*, 2002). Perlecam

aparentemente sustenta o crescimento e invasão de células tumorais através da habilidade de fatores angiogênicos armazenados (Iozzo *et al.*, 1994).

Considerando que as seqüências peptídicas selecionadas ligam-se a moléculas presentes em células melan-a transformadas e que podem, portanto, fornecer informações importantes na identificação de moléculas de adesão, migração e proliferação presentes na interação entre as células, foi investigada também a expressão de sindecam-4 e versicam (Figura 7B e 7C). O fato de proteoglicanos interferirem no potencial metastático fortalece a hipótese da expressão por células melan-a transformadas e ainda indica sua participação como uma das moléculas efetoras no processo tumoral.

Sindecam é um proteoglicano ligado a membrana que contém um grande domínio extracelular com cadeias de glicosaminoglicanos heparam sulfato ligados. Esse proteoglicano possui um conservado domínio transmembrana e um domínio citoplasmático pequeno que varia conforme o tipo de sindecam (Sasisekhara *et al.*, 2002; Tumova *et al.*, 2000a; Tumova *et al.*, 2000). Existem 4 tipos de sindecans já descritos em vertebrados: sindecam-1, sindecam-2 (fibroglicam), sindecam-3 (N-sindecam) e sindecam-4. Sindecam-4 ao contrário dos outros sindecans é encontrado em muitos tipos celulares e é o único que se localiza em um sítio especializado em adesão célula-matriz conhecido como adesão focal. Adesão focal é um complexo de membrana especializado em que integrinas e PGHSs cooperam para conectar matriz extracelular e citoesqueleto (Tumova *et al.*, 2000a; Tumova *et al.*, 2000). Sindecam é um proteoglicano presente na superfície celular, participa em processos de adesão celular, invasão e metástase. Componentes de MEC ligam ao sindecam, incluindo colágeno, fibronectina e vários fatores de crescimento (como bFGF, VEGF, fator de crescimento de queratinócito, entre outros) via cadeias de heparam sulfato. As cadeias de HS de sindecam também atuam como sítio de armazenamento para citocinas e promovem ligação de fatores de crescimento em receptores (Reiland *et al.*, 2004; Tumova *et al.*, 2000a; Tumova *et al.*, 2000).

Versicam é um grande proteoglicano de condroitin sulfato produzido em diversos tipos celulares e tumorais, incluindo melanoma. A presença de versicam na matriz extracelular tem papel fundamental no crescimento celular tumoral, adesão e migração, os quais podem ser alterados pela razão entre isoformas de versicam (Serra *et al.*, 2005). Foi inicialmente descrito em fibroblasto fetal humano, e, em humanos adultos tem sido encontrado no tecido conjuntivo e freqüentemente

associado à rede de fibras elásticas, músculo liso, cartilagem, sistema nervoso central e periférico, e em paredes de vasos e artérias elásticas. Na pele de adultos normais, versicam parece estar localizado na camada basal da epiderme, como também na camada reticular e papilar da derme (Touab *et al.*, 2002). Versicam é um proteoglicano produzido por diversos tipos celulares tumorais, incluindo melanoma, também presente na MEC. Quantidades aumentadas de versicam na MEC contribuem para crescimento celular, adesão e migração tumoral (Touab *et al.*, 2002). Há poucos relatos sobre melanoma e versicam numa correlação positiva entre aumento do seu nível e fenótipo tumorigênico. Entretanto, há evidências de um possível papel duplo de versicam, atuando como inibidor de crescimento tumoral e indutor de metástase (Serra *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2005). Mais ainda, numa linhagem celular canina (CML-10c2), que não expressa versicam, descrita por Serra *et al.* (2004), foi demonstrado que o aumento da expressão de versicam não é característica comum de todas as linhagens celulares tumorigênicas, e, talvez, nem de todos melanomas.

Muitos achados correlacionando a expressão de proteoglicanos e melanoma foram obtidos de melanoma canino ou humano em diferentes estágios de progressão, e, todos os modelos experimentais de transformação melanocítica empregavam agentes químico ou carcinogênico e manipulação genética para avaliar a progressão dessa doença. Nesse trabalho, nós mostramos o perfil de proteoglicanos num modelo *in vitro*, previamente obtido em nosso laboratório, no qual a linhagem celular não-tumorigênica, melan-a, co-cultivada com células B-1 resultou um fenótipo tumorigênico. Além disso, essa linhagem melan-a transformada expressa um perfil anormal de proteoglicanos quando comparado à linhagem celular não-transformada. Usando a metodologia de *phage display* definimos que perlecam é diferencialmente expresso nas células melan-a transformadas. Nossos resultados sugerem que a quantidade de perlecam presente nas células transformadas é maior que nas células normais, o que foi confirmado posteriormente por RT-PCR semiquantitativo. Esses achados não são suficientes, por si próprios, para considerar a expressão de perlecam como um marcador para malignidade, mas essa característica adiciona um perfil mais completo para essa condição.

Nosso trabalho mostra que níveis de sindecam-4 foram similares em ambas as linhagens celulares estudadas. Sindecam-4 ao contrário dos outros sindecans é encontrado em muitos tipos celulares e é o único que se localiza em um sítio

especializado em adesão célula-matriz conhecido como adesão focal (Tumova *et al.*, 2000a; Tumova *et al.*, 2000).

Surpreendentemente, os níveis de versicam observados nas células melan-a transformadas é menor em comparação às não-transformadas. Relatos sobre expressão de versicam em melanoma são escassos e um papel duplo dessa molécula é possivelmente sugerido. Aumento da expressão de versicam reduz crescimento tumoral por alterar capacidade apoptótica e proliferativa das células tumorais. O aumento de versicam induz também, alta produção de ácido hialurônico pelas células do estroma e inflamatórias, aumentando a migração celular (Serra *et al.*, 2006). Nosso trabalho suporta a idéia que a expressão de versicam pode também atuar como inibidor, visto que sua expressão é menor na linhagem celular transformada.

Células de melanoma variam no grau de pigmentação, morfologia celular e crescimento. Isto sugere que a heterogeneidade do melanoma reflete numa correspondente diversidade em fenótipos celulares normais que sofrem diferenciação melanocítica (Domenzain *et al.*, 2003). Assim, não todos os melanócitos transformados poderiam apresentar o mesmo perfil de expressão gênica, o que poderia explicar diferenças entre nossos achados e de outros trabalhos.

Em nosso modelo, a expressão de perlecam é significativamente aumentada após transformação (Figura 7A). Em paralelo, há diminuição da expressão de versicam na linhagem de melanoma, e níveis inalterados da expressão de sindecam-4 em ambas as linhagens (Figura 7B e 7C, respectivamente). Esses dados corroboram com o demonstrado no trabalho desenvolvido por Oba-Shinjo *et al.*, 2006, utilizando a mesma célula, melan-a, e outras linhagens tumorais derivadas dessa através de ciclos de bloqueio de adesão ao substrato, ao invés de co-cultivo com linfócitos B-1. Essa observação suporta a idéia de que o perfil de expressão gênica pode corresponder ao fenótipo do melanócito de origem. Essa heterogeneidade em melanomas associados com a escassa literatura sobre versicam desafia o uso desse proteoglicano como um marcador tumoral e sugere que versicam poderia ser usado como indicador de melanoma, mas em associação com outros marcadores, o que tornaria o diagnóstico clínico mais confiável.

Nosso modelo de carcinogênese melanocítica permite a identificação de alterações moleculares que precedem à transformação maligna. A expressão

elevada de perlecam em melanomas invasivos pode representar um marcador do fenótipo mais agressivo (Cohen *et al.*, 1994). Estudos posteriores são necessários para determinar como perlecam influencia a invasão de células tumorais e quais domínios da molécula podem implicar nesse processo em nosso modelo.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Pela metodologia de *phage display* observou-se que células melan-a transformadas, através do co-cultivo com linfócitos B-1, apresentam alterações na expressão de proteoglicanos;

Determinamos aumento da expressão de proteoglicano heparam sulfato, perlecan, em células melan-a transformadas quando comparado a células melan-a, níveis reduzidos de versican em células melan-a transformadas e inalterados de sindecam-4 nas duas linhagens celulares estudadas.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Adatia R, Albini A, Carlone S, Giunciuglio D, Benelli R, Santi I, Noonan DM. Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan cDNA. *Ann Oncol.* 1997; 8(12):1257-61.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Martin R, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula.* Artmed. 1997; 3:1255-1259.
- Almeida SR, Aroeira LS, Frymuller E, Dias MA, Bogsan CS, Lopes JD, Mariano M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int Immunol.* 2001; 13(9):1193-201.
- Alugupalli KR, Gerstein RM. Divide and conquer: division of labor by B-1 B cells. *Immunity.* 2005; 23(1):1-2.
- Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity.* 2004; 21(3):379-90.
- American Cancer Society. *Cancer & Figures, 2003,* Atlanta: American Cancer Society, 2003.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2007.* Atlanta: American Cancer Society, 2007.
- Antsiferova YS, Sotnikova NY, Posiseeva LV, Shor AL. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2005; 84(6):1705-11.
- Aramaki M, Nagasawa T, Koseki T, Ishikawa I. Presence of activated B-1 cells in chronic inflamed gingival tissue. *J Clin Immunol.* 1998; 18(6):421-9.
- Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science.* 1998; 279 (5349):377-80.
- Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* 2001; 63(1-3):8-18.
- Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A. Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell.* 1994; 79(6):1005-13.

Aviezer D, Iozzo RV, Noonan DM, Yayon A. Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(4):1938-46.

Barbas III, C.Burton, D.R., Scott, J., Silvermann, G.J. (editores) *Phage display*, a laboratory manual, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26(4):347-62.

Benitz WE, Kelley RT, Anderson CM, Lorant DE, Bernfield M. Endothelial heparan sulfate proteoglycan. I. Inhibitory effects on smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; 2(1):13-24.

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer.* 1987; 39(3):414-8.

Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:253-300.

Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:729-77.

Berto AG, Oba SM, Michelacci YM, Sampaio LO. Galactosaminoglycans from normal myometrium and leiomyoma. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(5):633-7.

Björkdahl O, Dohlsten M, Sjögren HO. Vaccination with B16 melanoma cells expressing a secreted form of interleukin-1beta induces tumor growth inhibition and an enhanced immunity against the wild-type B16 tumor. *Cancer Gene Ther.* 2000; 7(10):1365-74.

Bogenrieder T, Herlyn M. Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002; 44(1):1-15.

Bogsan CS, Novaes e Brito RR, Palos Mda C, Mortara RA, Almeida SR, Lopes JD, Mariano M. B-1 cells are pivotal for *in vivo* inflammatory giant cell formation. *Int J Exp Pathol.* 2005; 86(4):257-65.

Bottoni U, Izzo P, Richetta A, Mannooranparampil TJ, Devirgiliis V, Del Giudice M, Reale MG, Frati L, Calvieri S. S100 serum level: a tumour marker for metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2003;13(4):427-9.

Boumsell L, Bernard A, Lepage V, Degos L, Lemerle J, Dausset J. Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur J Immunol.* 1978; 8(12): 900-4.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 94p.

Brimacombe JS and Weber JM. Mucopolysaccharides – chemical structure, distribution and isolation. 1964. BBA Library, Elsevier Publishing Company, New York, 43-63.

Brito RR, De Lorenzo BH, Xander P, Godoy LC, Lopes JD, da Silva NP, Sampaio SC, Mariano M. Role of distinct immune components in the radiation-induced abrogation of systemic lupus erythematosus development in mice. *Lupus.* 2007; 16(12):947-54.

Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11(3):318-24.

Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, Carroll MC, Rajewsky K. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol.* 2004; 5(3):317-27.

Cazares LH, Adam BL, Ward MD, Nasim S, Schellhammer PF, Semmes OJ, Wright GL Jr. Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(8):2541-52.

Chammas R, Brentani RR. Cell-Matrix Interactions. *Encyclop Cancer.* 2002; 405-414.

Chevallier N, Berthelemy M, Le Rhun D, Laine V, Levy D, Schwartz-Cornil I. Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis and increased cell survival mainly involve the CD11b⁺ B-lymphocyte subset in sheep. *J Virol.* 1998; 72(5):4413-20.

Chiarugi VP, Vannucchi S. Surface heparan sulphate as a control element in eukariotic cells: a working model. *J Theor Biol.* 1976; 61(2):459-75.

Choo MK, Sakurai H, Koizumi K, Saiki I. Stimulation of cultured colon 26 cells with TNF-alpha promotes lung metastasis through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Lett.* 2005; 230(1):47-56.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest.* 2005; 115(4): 813-24.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984, 15(12):1147-65.

Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer.* 1991; 64(4):631-44.

Cloutier SM, Chagas JR, Mach JP, Gygi CM, Leisinger HJ, Deperthes D. Substrate specificity of human kallikrein 2 (hK2) as determined by *phage display* technology. *Eur J Biochem.* 2002; 269(11):2747-54.

Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* 2002; (12):3728-33.

Cohen IR, Murdoch AD, Naso MF, Marchetti D, Berd D, Iozzo RV. Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas. *Cancer Res.* 1994; 54(22):5771-4.

Cooper GM. A célula – uma abordagem molecular. *Artmed.* 2001.

Cordon-Cardo C, Prives C. At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med.* 1999; 190(10):1367-70.

Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* 1999; 13(11):1382-97.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 1994; 265 (5178):1582-4.

D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(14):6374-8.

David G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J.* 1993; 7(11):1023-30.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002; 417(6892):949-54.

de Wit NJ, van Muijen GN, Ruiter DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology.* 2004; 44(6):517-41.

Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med.* 1997; 242(1):41-8.

Dietrich CP, Armelin HA. Sulfated mucopolysaccharides from normal Swiss 3T3 cell line and its tumorigenic mutant ST1: possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978; 84(3):794-801.

Dietrich CP, Nader HB, Cohen DM, Michelacci YM. Structure of sulfated mucopolysaccharides from normal tissues and from patients with mucopolysaccharidoses. In *heparin structure, Cellular Function and Clinical Applications*, Mc Duffie, N.M. (Ed.), 1979, Acad. Press 39-49.

Dietrich CP, Nader HB, Straus AH. Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983; 111(3):865-71.

Dietrich CP, Paiva JF, Castro RA, Chavante SF, Jeske W, Fareed J, Gorin PA, Mendes A, Nader HB. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1428(2-3): 273-83.

Dietrich CP, Sampaio LO, Montes de Oca H, Nader HB. Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. *An Acad Bras Cienc.* 1980; 52(1):179-86.

Dietrich CP, Sampaio LO, Toledo OM, Cássaro CM. Cell recognition and adhesiveness: a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977; 75(2):329-36.

Dietrich CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res.* 1984,17(1): 5-15.

Domenzain C, Docampo MJ, Serra M, Miquel L, Bassols A. Differential expression of versican isoforms is a component of the human melanoma cell differentiation process. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1642(1-2):107-14.

Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2006; 5(6):403-8.

Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, Rio GD, Krajewski S, Lombardo CR, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen DE, Pasqualini R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med.* 1999; 5(9):1032-8.

Escudero AE. Estudo da expressão do proteoglicano de heparam sulfato (sindecam-4) por células endoteliais bloqueadas em G1 por PMA. *Biologia Molecular.* São Paulo, 2002 – UNIFESP.

Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest.* 2001; 108(2): 169-73.

Esko JD. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 1991; 3(5):805-16.

Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Seminars in Cancer Biology.* 2002; 12:89-96.

Fidler IJ. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation.* 2002; 70:498-505.

Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 1978; 38 (9):2651-60.

Fjeldstad K, Kolset SO. Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr Drug Targets.* 2005; 6(6):665-82.

Forsten KE, Courant NA, Nugent MA. Endothelial proteoglycans inhibit bFGF binding and mitogenesis. *J Cell Physiol.* 1997; 172(2):209-20.

Forster I, Rajewsky K. Expansion and functional activity of Ly-1⁺ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol.* 1987; 17(4):521-8.

Franco CR, Rocha HA, Trindade ES, Santos IA, Leite EL, Veiga SS, Nader HB, Dietrich CP. Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(8):971-5.

Fransson LA, Malmström A. Structure of pig skin dermatan sulfate 1. Distribution of D-glucuronic acid residues. *Eur J Biochem.* 1971; 18(3):422-30.

Fransson LA. Structure of dermatan sulfate. 3. The hybrid structure of dermatan sulfate from umbilical cord. *J Biol Chem.* 1968; 243(7): 1504-10.

Gallagher JT. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. *Curr Opin Cell Biol.* 1989, 1(6):1201-18.

Gambarini AG, Miyamoto CA, Lima GA, Nader HB, Dietrich CP. Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Mol Cell Biochem.* 1993; 124(2):121-9.

Gieni RS, Umetsu DT, DeKruyff RH. Ly-1 (CD5⁻) B cells produce interleukin (IL)-10. *Cell Immunol.* 1997; 175(2): 164-70.

Giordano RJ, Cardo-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med.* 2001; 7(11):1249-53.

Godoy LC, Mariano M, Lopes JD. Immunity and hypersensitivity to gp43 antigen in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2003; 41(5):427-36.

Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity.* 2005; 23(1):7-18.

Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(5):331-41.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1):57-70.

Hardy RR. B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(5):547-55.

Hardy RR. Variable gene usage, physiology and development of Ly-1⁺ (CD5⁺) B cells. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4(2):181-5.

Hascall VC and Hascall GK. Proteoglycans. *In: Cell biology of extracellular matrix.* ED Hay, editor. Plenum Press, New York. 1981; 39-63.

Hatae Y, Atsuta T, Makita A. Glycosaminoglycans in human lung carcinoma. *Gann*. 1977; 68(1):59-63.

Hay ED. Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation. *Cell Differ Dev*. 1990; 32(3):367-75.

Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med*. 1985; 161(6):1554-68.

Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med*. 1983; 157(1):202-18.

Hayakawa K, Shinton SA, Asano M, Hardy RR. B-1 cell definition. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 252:15-22.

Hayen W, Goebeler M, Kumar S, Riessen R, Nehls V. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci*. 1999; 112 (Pt 13):2241-51.

Herlyn M, Berking C, Li G, Satyamoorthy K. Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res*. 2000, 10(4):303-12.

Herlyn M, Padarathsingh M, Chin L, Hendrix M, Becker D, Nelson M, DeClerck Y, McCarthy J, Mohla S. New approaches to the biology of melanoma: a workshop of the National Institutes of Health Pathology B Study Section. *Am J Pathol*. 2002; 161(5):1949-57.

Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, Sidman C, Moore WA, Parks DR, Herzenberg LA. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev*. 1986; 93:81-102.

Herzenberg LA. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev*. 2000; 175:9-22.

Hoffman P, Meyer K. Structural studies of mucopolysaccharides of connective tissues. *Fed Proc*. 1962; 21:1064-9.

Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol*. 2001; 13(2):134-40.

Houghton NA & Polsky D. Focus on melanoma. *Cancer Cell*. 2002; 2(4):275-8.

Hsu MC, Toellner KM, Vinuesa CG, Maclennan IC. B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(15):5905-10.

Hudson JD, Shoabi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med.* 1999; 190(10):1375-82.

Ilan N, Mahooti S, Madri JA. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of *in vitro* angiogenesis. *J Cell Sci.* 1998; 111 (Pt 24):3621-31.

Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J.* 1994; 302 (Pt 3):625-39.

Iozzo RV, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 1996; 10(5):598-614.

Iozzo RV, San Antonio JD. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest.* 2001; 108(3):349-55.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67:609-52.

Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med.* 1992; 175(5):1213-20.

Jeronimo SM, Sales AO, Fernandes MZ, Melo FP, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Glycosaminoglycan structure and content differ according to the origins of human tumors. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27(9):2253-8.

Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; (4):251-65.

Jouault T, Fradin C, Dzierszynski F, Borg-Von-Zepelin M, Tomavo S, Corman R, Trinel PA, Kerckaert JP, Poulain D. Peptides that mimic *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked mannosides. *Glycobiology.* 2001;11(8):693-701.

Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:501-38.

Karras JG, Wang Z, Huo L, Howard RG, Frank DA, Rothstein TL. Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is constitutively activated in normal, self-renewing B-1 cells but only inducibly expressed in conventional B lymphocytes. *J Exp Med.* 1997; 185(6):1035-42.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; (4):239-57.

Kim HR, Wheeler MA, Wilson CM, Iida J, Eng D, Simpson MA, McCarthy JB, Bullard KM. Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells *in vitro* via interaction with CD44. *Cancer Res*. 2004; 64(13):4569-76.

Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science*. 1998; 280(5366):1036-7.

Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*. 1991; 60:443-75.

Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands with *phage display* peptide libraries. *J Nucl Med*. 1999; 40(5):883-8.

Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from *phage display* library. *J Biol Chem*. 1993; 268(27):20205-10.

Koivunen E, Restel BH, Rajotte D, Lahdenranta J, Hagedorn M, Arap W, Pasqualini R. Integrin-binding peptides derived from *phage display* libraries. *Methods Mol Biol*. 1999; 129:3-17.

Korsmeyer SJ. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10:785-807.

Kosir MA, Wang W, Zukowski KL, Tromp G, Barber J. Degradation of basement membrane by prostate tumor heparanase. *J Surg Res*. 1999; 81(1):42-7.

Krueger JS, Keshamouni VG, Atanaskova N, Reddy KB. Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene*. 2001; 20(31):4209-18.

Lassam N, Bickford S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene*. 1992; 7(1):51-6.

Lewis TB, Robison JE, Bastien R, Milash B, Boucher K, Samlowski WE, Leachman SA, Dirk Noyes R, Wittwer CT, Perreard L, Bernard PS. Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*. 2005; 104(8):1678-86.

Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today*. 2000; 6(4):163-9.

Lindahl U, Höök M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu Rev Biochem*. 1978; 47:385-417.

Liotta LA, Rao CN, Wewer UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55:1037-57.

Liotta LA, Rao CN. Tumor invasion and metastasis. *Monogr Pathol.* 1986; (27):183-92.

Liotta LA. Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1986; 46(1):1-7.

Liu D, Shriver Z, Venkataraman G, El Shabrawi Y, Sasisekharan R. Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(2):568-73.

Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61(13): 5207-14.

Lopes CC. Transfecção com oncogene EJ-ras afeta adesão, migração, ciclo celular e expressão do proteoglicano de heparan sulfato (sindecam-4) de células endoteliais. *Bioquímica, Biologia Molecular.* São Paulo, 2004 - UNIFESP:145.

Malmström A, Fransson LA. Structure of pig skin dermatan sulfate. 2. Demonstration of sulfated iduronic acid residues. *Eur J Biochem.* 1971; 18(3):431-5.

Marcelino França K, Vericimo MA, Retamal C, Kipnis TL, Arnholdt AC. B1 cells contribution to susceptibility in experimental paracoccidioidomycosis: immunoglobulin isotypes and repertoire determination. *Med Mycol.* 2006; 44(8):755-66.

Marks DB. *Biochemistry: board review series* Harwal Publishing, 2^o edição. 1994.

Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity.* 2001; 14(5):617-29.

McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature.* 1991; 349(6306):254-6.

McGary EC, Heimberger A, Mills L, Weber K, Thomas GW, Shtivelband M, Lev DC, Bar-Eli M. A fully human antimelanoma cellular adhesion molecule/MUC18 antibody inhibits spontaneous pulmonary metastasis of osteosarcoma cells *in vivo*. *Clin Cancer Res.* 2003; 15:6560-66.

Medic S, Pearce RL, Heenan PJ, Ziman M. Molecular markers of circulating melanoma cells. *Pigment Cell Res.* 2007; 20(2):80-91.

Mendiratta SK, Thai G, Eslahi NK, Thull NM, Matar M, Bronte V, Pericle F. Therapeutic tumor immunity induced by polyimmunization with melanoma antigens gp100 and TRP-2. *Cancer Res.* 2001, 61(3):859-63.

Meyer K, Smyth EM, Dawson MH. The nature of the muco-polysaccharide of synovial fluid. *Science.* 1938; 88(2275):129.

Michelacci YM, Dietrich CP. Studies on the induction of a chondroitinase in *Flavobacterium heparinum*. *Biochimie.* 1973; 55(8):893-8.

Miller AJ & Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006; 355:51-65.

Minoprio P, el Cheikh MC, Murphy E, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coffman R, Coutinho A, O'Garra A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol.* 1993 ;151(8):4200-8.

Mintz PJ, Kim J, Do KA, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, Arap MA, Hong WK, Troncoso P, Logothetis CJ, Pasqualini R, Arap W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol.* 2003; 21(1):57-63.

Mohan C, Morel L, Yang P, Wakeland EK. Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(9):1652-62.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:165-90.

Morse, H. C. *Origins of inbred mice* (Academic Press. New York, 1978).

Müller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol.* 2003;21(9):1040-6.

Murakami M, Honjo T. Involvement of B-1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunol Today.* 1995; 16(11):534-9.

Murakami M, Tsubata T, Okamoto M, Shimizu A, Kumagai S, Imura H, Honjo T. Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature.* 1992; 357(6373):77-80.

Nader HB and Dietrich CP. Natural occurrence and possible biological role of heparin. *In: Heparin: Chemical and Biological Properties Clinical Applications.* Edward Arnold, London, 1989; 81-96.

Nader HB, Chavante SF, dos-Santos EA, Oliveira TW, de-Paiva JF, Jerônimo SM, Medeiros GF, de-Abreu LR, Leite EL, de-Sousa-Filho JF, Castro RA, Toma L,

Tersariol IL, Porcionatto MA, Dietrich CP. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? Braz J Med Biol Res. 1999;32(5):529-38.

Nader HB, Dietrich CP, Buonassisi V, Colburn P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84(11):3565-9.

Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, Jasiulionis MG. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. Neoplasia. 2006; 8(3):231-41.

O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. Eur J Immunol. 1992; 22(3):711-7.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res. 1999, 59(19):5002-11.

Paciorkowski N, Porte P, Shultz LD, Rajan TV. B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. J Exp Med. 2000; 191(4):731 -6.

Pérez EC, Machado J Jr, Aliperti F, Freymüller E, Mariano M, Lopes JD. B-1 lymphocytes increase metastatic behavior of melanoma cells through the extracellular signal-regulated kinase pathway. Cancer Sci. 2008; 99(5):920-8.

Perlin AS, Mackie DM, Dietrich CP. Evidence for a (1 leads to 4)-linked 4-O-(L-idopyranosyluronic acid 2-sulfate)-(2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranosyl 6-sulfate) sequence in heparin. Long-range H-H coupling in 4-deoxy-hex-4-enopyranosides. Carbohydr Res. 1971; 18(2):185-94.

Petricevich VL, Michelacci YM. Proteoglycans synthesized *in vitro* by nude and normal mouse peritoneal macrophages. Biochim Biophys Acta. 1990;1053(2-3):135-43.

Pinhal MA, Silva IF, Lee TC, Dietrich CP, Nader HB. Binding of heparin and compound Y to endothelial cells stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan. Braz J Med Biol Res. 1994, 27(9):2191-5.

Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a

decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 1998, 396(6712):699-703.

Población CA, Michelacci YM. Structural differences of dermatan sulfates from different origins. *Carbohydr Res*. 1986; 147(1):87-100.

Porcionatto MA, Nader HB, Dietrich CP. Heparan sulfate and cell division. *Braz J Med Biol Res*. 1999, 32(5):539-44.

Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marmé D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 1995, 14(4):263-77.

Reiland J, Sanderson RD, Waguespack M, Barker SA, Long R, Carson DD, *et al*. Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion. *J Biol Chem*. 2004;279(9):8047-55.

Sahai E, Olson MF, Marshall CJ. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J*. 2001; 20(4):755-66.

Salmivirta M, Jalkanen M. Syndecan family of cell surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. *Experientia*. 1995;51(9-10):863-72.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Sampaio LO, Dietrich CP, Filho OG. Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and in cancer tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 498(1):123-31.

Sampaio LO, Dietrich CP. Changes of sulfated mucopolysaccharides and mucopolysaccharidases during fetal development. *J Biol Chem*. 1981; 256(17):9205-10.

Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol*. 2001; 12(2):89-98.

Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):521-8.

Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res*. 2003; 63(4):756-9.

Sauter ER, Herlyn M.. Molecular biology of human melanoma development and progression. *Mol Carcinog.* 1998; 23(3):132-43.

Serra M, Miquel L, Domenzain C, Docampo MJ, Fabra A, Wight TN, Bassols A. V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential. *Int J Cancer.* 2005; 114(6):879-86.

Serra M, Pastor J, Domenzain C, Bassols A. Effect of transforming growth factor-beta1, insulin-like growth factor-I, and hepatocyte growth factor on proteoglycan production and regulation in canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res.* 2002;63(8):1151-8.

Serra M, Rabanal RM, Miquel L, Domenzain C, Bassols A. Differential expression of CD44 in canine melanocytic tumours. *J Comp Pathol* 2004;130(2-3):171-80.

Serra ML, Serra M, Hernández D, Domenzain C, Docampo MJ, Rabanal RM, *et al.* V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. *Lab Invest* 2006; 86(9):889-901.

Sharma B, Handler M, Eichstetter I, Whitelock JM, Nugent MA, Iozzo RV. Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *J Clin Invest.* 1998; 102(8):1599-608.

Silva M, Dietrich CP, Nader HB. On the structure of heparitin sulfates. Analyses of the products formed from heparitin sulfates by two heparitinases and a heparinase from *Flavobacterium heparinum*. *Biochim Biophys Acta.* 1976, 437(1):129-41.

Silva ME, Dietrich CP. Structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. *J Biol Chem.* 1975; 250(17):6841-6.

Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92(10):4562-6.

Skobe M, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95(3):1050-5.

Smalley KS, Herlyn M. The great escape: another way for melanoma to leave physiological control? *J Invest Dermatol.* 2003;121(4):xi-xii.

Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 1993; 217:228-57.

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985; 228(4705):1315-7.

Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* 1999; 103(9):1237-41.

Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature.* 1990; 348(6299):331-3.

Suzuki S, Saito H, Yamagata T, Anno K, Seno N, Kawai Y, Furuhashi T. Formation of three types of disulfated disaccharides from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion. *J Biol Chem.* 1968; 243(7):1543-50.

Tanaka M, Kaneda Y, Fujii S, Yamano T, Hashimoto K, Huang SK, Hoon DS. Induction of a systemic immune response by a polyvalent melanoma-associated antigen DNA vaccine for prevention and treatment of malignant melanoma. *Mol Ther.* 2002; 5(3):291-9.

Timar J, Lapis K, Dudas J, Sebestyén A, Kopper L, Kovalszky I. Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(3):173-86.

Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology.* 2002; 12(3):37R-42R.

Touab M, Villena J, Barranco C, Arumi-Uria M, Bassols A. Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol.* 2002; 160(2):549-57.

Trepel M, Grifman M, Weitzman MD, Pasqualini R. Molecular adaptors for vascular-targeted adenoviral gene delivery. *Hum Gene Ther.* 2000; 11(14):1971-81.

Tryggvason K, Höyhty M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta.* 1987;907(3):191-217.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004; 351:998-1012.

Tumova S, Woods A, Couchman JR. Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. *J Biol Chem.* 2000, 275(13):9410-7.

Tumova S, Woods A, Couchman JR. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000a, 32(3):269-88.

Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med.* 1995; 182(3):689-98.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988; 335(6189):440-2.

Vigna AF, Almeida SR, Xander P, Freymüller E, Mariano M, Lopes JD. Granuloma formation *in vitro* requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. *Microbes Infect.* 2006; 8(3):589-97.

Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 1999; 5(7):793-802.

Vlodavsky I, Goldshmidt O, Zcharia E, Atzmon R, Rangini-Guatta Z, Elkin M, Peretz T, Friedmann Y. Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(2):121-9.

Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene.* 1997; 14(12):1495-502.

Wascher RA, Morton DL, Kuo C, Elashoff RM, Wang HJ, Gerami M, Hoon DS. Molecular tumor markers in the blood: early prediction of disease outcome in melanoma patients treated with a melanoma vaccine. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21:2558-2563.

Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 1997; 91(4):439-42.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem.* 1996; 271(17):10079-86.

Wielenga VJ, van der Voort R, Taher TE, Smit L, Beuling EA, van Krimpen C, Spaargaren M, Pals ST. Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1563-73.

Wilson LL, Tran L, Morton DL, Hoon DS. Detection of differentially expressed proteins in early-stage melanoma patients using SELDI-TOF mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1022:317-22.

Wolfrom ML, Conigliaro PJ, Bhat HB. Pyrimidine nucleosides of the furanose form of 2-amino-2-deoxy-D-glucose. *Carbohydr Res.* 1971; 20(2):383-90.

Won WJ, Kearney JF. CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. *J Immunol* 2002; 168(11):5605 –11.

Wong SC, Chew WK, Tan JE, Melendez AJ, Francis F, Lam KP. Peritoneal CD5⁺ B-1 cells have signaling properties similar to tolerant B cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(34):30707-15.

World Health Organization (WHO). Cancer. Geneva: World Health Organization; 2007 [cited 2007 Oct 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>). Fact sheet n° 297. Feb 2006.

Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990; 4(6):1577-90.

Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, Aingorn H, Elkin M, Friedmann Y, Weinstein T, Li JP, Lindahl U, Vlodavsky I. Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior. *FASEB J.* 2004; 18(2):252-63.

Zhang Y, Thant AA, Machida K, Ichigotani Y, Naito Y, Hiraiwa Y, Senga T, Sohara Y, Matsuda S, Hamaguchi M. Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer Res.* 2002; 62(14):3962-5.

Zurita AJ, Arap W, Pasqualini R. Mapping tumor vascular diversity by screening *phage display* libraries. *J Control Release.* 2003; 91(1-2):183-6.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)