

LUANA CHEVEN PERBORE DOS SANTOS

**MECANISMO DE CITOTOXICIDADE
DO ANTICORPO MONOCLONAL A4,
QUE RECONHECE PROTOCADERINA β 13,
EM CÉLULAS TUMORAIS MURINAS E HUMANAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia e Imunologia.

São Paulo

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LUANA CHEVEN PERBORE DOS SANTOS

**MECANISMO DE CITOTOXICIDADE
DO ANTICORPO MONOCLONAL A4,
QUE RECONHECE PROTOCADERINA β 13,
EM CÉLULAS TUMORAIS MURINAS E HUMANAS**

Orientadora: Prof. Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Rodolpho Travassos

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de Mestre
em Microbiologia e Imunologia.

São Paulo

2010

Santos, Luana Cheven Perbore dos

Mecanismo de Citotoxicidade do Anticorpo Monoclonal A4, que Reconhece Protocaderina β 13, em Células Tumorais Murinas e Humanas / Luana Cheven Perbore dos Santos – São Paulo, 2010.

150 folhas.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Título em inglês: **Cytotoxic Mechanism of Monoclonal Antibody A4, which Recognizes Protocadherin β 13, in Murine and Human Tumor Cells.**

- | | | |
|----------------------------|-----------------------------|--------------|
| 1. Anticorpo monoclonal A4 | 2. Protocaderina β 13 | 3. Melanoma |
| 4. Apoptose | 5. β -catenina | 6. Autofagia |

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einsten

Lá bem no alto do décimo segundo andar do Ano
Vive uma louca chamada Esperança
E ela pensa que quando todas as sirenas
Todas as buzinas
Todos os reco-recos tocarem
Atira-se
E
— ó delicioso vôo!
Ela será encontrada miraculosamente incólume na calçada,
Outra vez criança...
E em torno dela indagará o povo:
— Como é teu nome, meninazinha de olhos verdes?
E ela lhes dirá
(É preciso dizer-lhes tudo de novo!)
Ela lhes dirá bem devagarinho, para que não esqueçam:
— O meu nome é ES-PE-RAN-ÇA...

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

À Elaine, minha orientadora e amiga. Obrigada pela oportunidade, pela excelente orientação, por todas as horas de dedicação e, principalmente, obrigada por seu apoio, confiança e amizade. Espero que nossa parceria continue prosperando e nos rendendo belíssimos frutos.

Ao Prof. Dr. Luiz Rodolpho Travassos, obrigada pela co-orientação e por toda dedicação, paciência e conselhos. Obrigada por ser um exemplo a todos nós.

Aos Prof. Dr. Renato Arruda Mortara e Prof. Dr. Joel Machado Júnior da UNIFESP, colaboradores e instrutores que ajudaram a realizar este trabalho. Obrigada pelo apoio intelectual, pelo interesse e pela motivação.

À Dra. Denise Costa Arruda, minha amiga e colaboradora. Obrigada pela colaboração nos experimentos de apoptose e autofagia, mas obrigada principalmente pelo apoio, confiança e amizade.

Aos membros da banca, obrigada pelas críticas e sugestões. Obrigada por ajudarem a tornar um sonho realidade.

Ao Prof. Dr. Michel Vincentz da UNICAMP, meu orientador da Iniciação Científica, que me guiou nos primeiros passos da pesquisa científica. *Merci beaucoup!*

Aos professores da minha graduação e pós-graduação que me ensinaram que a ciência é bela e infinita. Obrigada por minha formação.

Aos grandes amigos do laboratório: Denise, Anna Paula, Ana Cláudia e Carlos. Obrigada pela amizade de vocês. Obrigada pelas conversas intermináveis, pelas risadas, pela compreensão, motivação e esperança que me passaram. Vocês estarão sempre no meu coração porque são únicos.

Aos colegas do laboratório: Adriana, Aline, Alini, Alisson, Ana Beatriz, Bianca, Camyla, Daniela, Ellen, Fabiana, Felipe, Filipe, Flávia, Karina, Jorge, Luís, Marcus, Mariana, Manoela, Natasha e Thaísa. Obrigada pela amizade, pelo aprendizado e pelos momentos de diversão dentro da UNONEX.

Obrigada a todos os professores, alunos e funcionários do 8º, 6º e 4º andares do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP. Obrigada pela ajuda em todos os momentos. Mas obrigada principalmente pela convivência, aprendizado e amizade.

Obrigada aos meus amigos de todas as horas e situações: Aline Brandão, Gislane, Edson, Thaís e Aline Malheiro. A amizade de vocês significa muito para mim.

Obrigada à minha família enorme e que infelizmente mora tão longe! A todos os tios, tias, primos e primas. O laço de amor e amizade que existe entre nós supera qualquer distância.

E obrigada aos grandes amores da minha vida: minha mãe e minhas irmãs caninas – Bebê, Tomba, Dois e Sheila. Mãe, obrigada pela vida, pelo amor, pela educação, pela amizade e pelo incentivo em tudo. Bezinha, obrigada por ser minha irmã “cruelinha” e por me amar incondicionalmente. Obrigada por estudar comigo durante todos esses anos e por me mostrar o que é prioridade. Tombinha, uma verdadeira *lady*. Docinha, você é número um. Sheilinha, você é com certeza legítima! Somos um quinteto terrível!

Obrigada à FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Obrigada à UNICAMP e a UNIFESP pela excelente formação acadêmica.

ÍNDICE

Lista de Abreviações.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Melanócitos e melanoma.....	1
1.2. Imunoterapia e câncer.....	4
1.3. Anticorpos e regiões determinantes de complementariedade (CDRs).....	9
1.4. Protocaderinas.....	10
1.5. Apoptose e sinalização intracelular.....	16
1.5.1. Via das caspases.....	17
1.5.2. Via Wnt/ β -catenina.....	21
1.5.2.1. Via Canônica: ativação de TCF/LEF.....	21
1.5.2.2. Via não-canônica: ativação de FOXO.....	24
1.5.2.3. β -catenina e complexos de adesão celular.....	26
1.5.2.4. β -catenina e melanoma.....	26
2. Objetivos.....	28
2.1. Geral.....	28
2.2. Específicos.....	28
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1. Animais.....	29
3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo.....	29

3.3. Produção, purificação e reatividade do mAb A4.....	31
3.3.1. Produção e purificação do mAb A4 por cromatografia de afinidade.....	31
3.3.2. ELISA Quimioluminescente (ELISA-Q).....	33
3.3.3. <i>Immunoblotting</i>	34
3.3.4. Imunofluorescência Indireta com células previamente fixadas.....	35
3.3.5. Imunofluorescência Indireta com células fixadas após tratamento com o mAb A4 <i>in vitro</i>	37
3.4. Expressão gênica da PCDH β 13.....	38
3.4.1. Extração de RNA total.....	38
3.4.2. Síntese de cDNA.....	39
3.4.3. RT- PCR, purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento.....	40
3.5. Citotoxicidade e mecanismo de morte celular desencadeado pelo mAb A4 em células tumorais.....	42
3.5.1. Avaliação da viabilidade celular.....	42
3.5.2. Análise da exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática.....	43
3.5.3. Ensaio para verificação da ativação de caspases.....	44
3.5.4. Ensaio para verificação da produção de espécies reativas de oxigênio....	44
3.5.5. Ensaio para verificação de condensação da cromatina	45
3.5.6. Ensaio para verificação de degradação do DNA: formação do <i>DNA ladder</i> em gel de agarose..	45
3.5.7. Ensaio para verificação de degradação do DNA: TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i>).....	47
3.5.8. Microscopia eletrônica de transmissão.....	48
3.6. Determinação da via de sinalização intracelular induzida pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1.....	48

3.6.1. <i>Immunoblotting</i>	48
3.6.2. Localização celular da β -catenina.....	50
4. Resultados.....	51
4.1. Produção e purificação do mAb A4.....	52
4.2. Reatividade do mAb A4 com linhagens tumorais murinas e humanas.....	54
4.2.1. ELISA Quimioluminescente (ELISA-Q).....	54
4.2.2. <i>Immunoblotting</i>	57
4.2.3. Imunofluorescência Indireta.....	58
4.3. Expressão gênica da PCDH β 13 em linhagens tumorais murinas e humanas.....	60
4.3.1. Análise da expressão do gene PCDH β 13.....	60
4.3.2. Análise da expressão da proteína PCDH β 13.....	63
4.4. Citotoxicidade do mAb A4 independente do complemento sobre linhagens tumorais murinas e humanas.....	63
4.5. Mecanismo de morte celular desencadeado pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 em linhagens de melanoma murino e humano.....	69
4.5.1. Internalização do mAb A4.....	69
4.5.2. Exposição de fosfatilserina na membrana plasmática.....	76
4.5.3. Ativação de caspases.....	78
4.5.4. Geração de espécies reativas de oxigênio.....	79
4.5.5. Condensação da cromatina.....	82
4.5.6. Degradação oligonucleossomal do DNA.....	84
4.5.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....	90
4.6. Sinalização intracelular induzida pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1.....	94
4.6.1. Avaliação por <i>Immunoblotting</i>	94

4.6.2. Avaliação da localização subcelular da β -catenina por Imunofluorescência.....	96
5. Discussão.....	100
6. Conclusões.....	118
7. Perspectivas.....	119
8. Referências Bibliográficas.....	120
Anexos.....	129
Anexo I: Comitê de Ética para Experimentação Animal da UNIFESP.....	130
Anexo II: Apresentações do trabalho em Congressos.....	132

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
Alum	Adjuvante hidróxido de alumínio
cDNA	DNA complementar
CDC	Citotoxicidade celular dependente de complemento
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DHE	Diidroetídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA-Q	ELISA Quimioluminescente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Ig	Imunoglobulina
KDa	Quilodáton
LAMP-1	<i>Lysosomal associated membrane protein-1</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
mAb	Anticorpo monoclonal
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salina
PCDH	Protocaderina
PCDHβ13	Protocaderina β 13
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em transcrição reversa
TCF	<i>T-cell factor</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Tris	Hidroximetil amino metano
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da PCDH β 13 murina.....	16
Figura 2. Vias de ativação das caspases.	20
Figura 3. Via canônica de sinalização Wnt/ β -catenina.	23
Figura 4. Via de sinalização de β -catenina por FOXO e competição com o fator TCF/LEF.....	25
Figura 5. Purificação e reatividade do mAb A4 com células do melanoma murino B16F10-Nex2.....	
Figura 6. Reatividade do mAb A4 com linhagens tumorais murinas e humanas em ensaio de ELISA-Q.....	56
Figura 7. Reatividade do mAb A4 com linhagens tumorais murinas e humanas em <i>Immunoblotting</i>	57
Figura 8. MAb A4 e o anticorpo policlonal de camundongo reativo com a PCDH β 13 humana reconhecem células murinas e humanas em Imunofluorescência Indireta.....	59
Figura 9. Análise da qualidade do RNA total extraído a partir de células tumorais murinas e humanas.....	60
Figura 10. Análise da expressão do mRNA da PCDH β 13 em linhagens tumorais murinas e humanas.....	61
Figura 11. Citotoxicidade do mAb A4 independente do complemento sobre linhagens tumorais murinas e humanas.....	67
Figura 12. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas.	71
Figura 13. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas.....	72
Figura 14. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas.....	73

Figura 15. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas não-lisossomais.....	75
Figura 16. Exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática induzida pelo tratamento do melanoma murino B16F10-Nex2.1 com mAb A4.....	77
Figura 17. mAb A4 induz ativação das caspases-9, -3 e -6 no melanoma murino B16F10-Nex2.1.....	79
Figura 18. mAb A4 induz a produção de íons superóxido no melanoma murino B16F10-Nex2.1.	81
Figura 19. mAb A4 induz condensação da cromatina e a fragmentação nuclear em células tumorais murinas e humanas.....	83
Figura 20. mAb A4 induz degradação oligonucleossomal de DNA em linhagens tumorais murinas e humanas.....	85
Figura 21. Ensaio de TUNEL para demonstrar a degradação oligonucleossomal na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 após tratamento com mAb A4.....	87
Figura 22. Ensaio de TUNEL para demonstrar a degradação oligonucleossomal na linhagem de melanoma humano A2058 após tratamento com mAb A4.....	88
Figura 23. Ensaio de TUNEL para demonstrar a degradação oligonucleossomal na linhagem de melanoma humano A2058 após tratamento com mAb A4.....	89
Figura 24. Microscopia eletrônica de transmissão de células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 não tratadas com o mAb A4.....	91
Figura 25. Microscopia eletrônica de transmissão de células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 tratadas por 18 h com o mAb A4.....	94
Figura 26. O tratamento com 500 µg/mL de mAb A4 diminui a quantidade de β-catenina e de TCF-4 em células do melanoma murino B16F10-Nex2.1.....	96
Figura 27. O tratamento com 500 µg/mL de mAb A4 redistribui β-catenina em células do melanoma murino B16F10-Nex2.1.....	98

Figura 28. O tratamento com 500 µg/mL de mAb A4 redistribui β-catenina em células do melanoma murino A2058.....	99
Figura 29. Mecanismo de citotoxicidade proposto para a interação entre o mAb A4 e a proteína transmembrana PCDHβ13.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados para a terapia contra o câncer.....	6
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos genes da PCDHβ13 e da β-actina.....	40
Tabela 3. Condições para amplificação do gene da PCDHβ13 murina e humana.....	41
Tabela 4. Condições para amplificação do gene da β-actina murina e humana.....	41
Tabela 5. Condições dos ciclos para amplificação utilizados.....	41
Tabela 6. Resultado da análise pelo programa BLAST das sequências direta e reversa do fragmento gerado a partir do RNA total obtido da linhagem tumoral HCT-8 por RT-PCR com <i>primers</i> específicos para a PCDHβ13 humana.....	62
Tabela 7. Concentração Inibitória 50% (IC ₅₀) para o mAb A4, detecção de mRNA da Protocaderina β13 (PCDHβ13) em ensaio de RT-PCR, e detecção da expressão da proteína PCDHβ13 em ensaio de <i>Immunoblotting</i> para as linhagens tumorais selecionadas.....	68

RESUMO

O melanoma cutâneo é um tumor originado a partir da proliferação descontrolada de melanócitos. A incidência do melanoma maligno tem aumentado significativamente nas últimas décadas e se tornado um problema de saúde pública em muitos países. Na imunoterapia contra o câncer, anticorpos monoclonais (mAbs) são utilizados como ferramentas para diagnóstico, monitoramento e tratamento da doença. A descoberta de novos alvos terapêuticos para mAbs em células tumorais, e a determinação dos mecanismos de citotoxicidade gerados pelos mesmos pode ampliar significativamente as possibilidades e o sucesso dos tratamentos.

Anteriormente em nosso laboratório, Dobroff e colaboradores (2002) isolaram um mAb (mAb A4) que foi citotóxico *in vitro* sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2 e sobre algumas células tumorais humanas, efeito independente do complemento, mas aumentado por este. O mAb A4 reduziu o desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2 *in vivo*, aumentando a sobrevivência dos animais. O alvo do mAb A4 na superfície celular é a proteína Protocaderina $\beta 13$ (PCDH $\beta 13$), membro da superfamília das caderinas. A interação entre ambos levou as células tumorais à morte, em processo sugestivo de apoptose (Dobroff *et. al.*, 2010, em publicação).

Neste trabalho, verificamos a reatividade do mAb A4 com células do melanoma murino e com algumas outras linhagens tumorais humanas através de ELISA-Quimioluminescente e Imunofluorescência Indireta. A expressão do gene *Pcdh $\beta 13$* foi verificada por RT-PCR não quantitativo e a expressão da proteína PCDH $\beta 13$, por *Immunoblotting*. Verificou-se que, somente células que expressam a proteína PCDH $\beta 13$ na membrana plasmática são suscetíveis à ação do mAb A4. O mAb A4 foi citotóxico *in vitro* contra o melanoma murino e contra linhagens tumorais humanas, incluindo melanoma, carcinoma de cólon, carcinoma de cérvix uterino e glioblastoma. O mAb

A4 não foi citotóxico contra linhagens humanas de carcinoma de mama e contra a linhagem de melanócitos murinos imortalizados melan A, que não expressam a PCDH β 13.

A interação do mAb A4 com células B16F10-Nex2.1 *in vitro* ocasionou a endocitose do mAb A4 em vesículas, rápida redução nos níveis de β -catenina livre no citoplasma e do fator de transcrição TCF-4, redistribuição da β -catenina para a periferia celular, ativação das caspases-9, -3 e -6, exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática, condensação da cromatina e degradação internucleossomal do DNA, corroborando a indução de um processo de morte por apoptose pela via intrínseca nessa célula tumoral. Adicionalmente, observou-se o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que podem amplificar o processo apoptótico. A inibição da via de sinalização da β -catenina sugere que vias de sinalização intracelular que regulam o crescimento e a sobrevivência foram inibidas pela interação entre o mAb A4 e seu alvo na célula. A presença de vesículas sugestivas de autofagossomos nas imagens de microscopia de transmissão eletrônica pode indicar a indução de um processo de autofagia em paralelo ao processo apoptótico.

Concluimos que o mAb A4 demonstrou ser um potencial agente anti-tumoral com atividade contra diversos tipos de tumores murinos e humanos. A proteína PCDH β 13 pode ser um potencial marcador de malignidade para o melanoma. A interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 levou a célula de melanoma à morte através da inibição da via de sinalização intracelular β -catenina/TCF-4 e da indução de apoptose pela via intrínseca. O processo de autofagia pode ter uma possível participação no efeito anti-tumoral induzido pelo mAb A4.

ABSTRACT

Malignant melanoma is a highly metastatic skin cancer which arises from malignant transformation of melanocytes. Incidence of melanoma has been increasing in the last decades, becoming a major public health problem in many countries. Monoclonal antibodies (mAbs) have been used in cancer immunotherapy as tools for diagnosis, monitoring and treatment of tumors. The discovery of new therapeutic targets for mAbs in tumor cells, and the establishment of their cytotoxic mechanisms might significantly improve the possibilities and efficacy of cancer treatments.

Previously in our research group, Dobroff and collaborators (2002) produced a mAb, named A4, which was cytotoxicity *in vitro* against B16F10-Nex2 murine melanoma cells and some human tumor cell lines. This effect was independent of complement, although enhanced by it. MAb A4 decreased B16F10-Nex2 murine melanoma development *in vivo*, significantly increasing animal survival. This mAb recognizes Protocadherin β 13 (PCDH β 13) at tumor cell surface, a protein that belongs to the cadherin superfamily, and preliminary results suggested that mAb A4/PCDH β 13 interaction leads tumor cell to apoptosis (Dobroff *et. al.*, 2010, in press).

In the present work, mAb A4 reactivity with murine melanoma cells and several human tumor cell lines was verified by Chemoluminescent ELISA and Indirect Immunofluorescence assays. *Pcdh β 13* mRNA expression was detected by non-quantitative RT-PCR and PCDH β 13 protein expression by Immunoblotting assay. Only PCDH β 13-expressing tumor cells were susceptible to mAb A4 cytotoxicity. MAb A4 was cytotoxic *in vitro* to murine melanoma and to human tumor cell lines, including melanoma, colon carcinoma, cervical uterine epithelioid carcinoma and glioblastoma.

MAb A4 had no activity against breast carcinoma cell lines and murine immortalized melanocytes melan A, which do not express PCDH β 13.

MAb A4 interaction with B16F10-Nex2.1 cells *in vitro* triggered mAb A4 endocytosis, rapid reduction of free cytoplasmic β -catenin and TCF-4 concentrations, redistribution of β -catenin to cell periphery, caspases-9, -3, and -6 activation, phosphatidilserine translocation to cell membrane, chromatin condensation and internucleosomal DNA fragmentation, confirming the induction of mitochondrial-dependent apoptosis in that tumor cell line. Additionally, mAb A4 induced overproduction of oxygen reactive species, which can amplify the apoptotic process. The inhibition of β -catenin signaling suggests that signaling pathways that regulate cell survival and growth were inhibited by mAb A4 interaction with its target on the cell surface. Transmission electron microscopy images revealed the presence of autophagosomes, suggesting the simultaneous induction of autophagy and apoptosis by mAb A4.

We conclude that mAb A4 may represent a new therapeutic agent with antitumor activity against murine and human tumors. PCDH β 13 is a potential melanoma marker. MAb A4 interaction with PCDH β 13 induced cell death through inhibition of β -catenin/TCF-4 signaling pathway and induction of the apoptosis intrinsic pathway. The autophagic process might be also implicated in mAb A4 cytotoxic effect.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Melanócitos e melanoma

Melanócitos são células pigmentadas da pele derivadas de melanoblastos, progenitores da crista neural que migram para a camada basal da epiderme e para os folículos pilosos durante o processo de embriogênese (Kamstrup *et.al.*, 2007; Mimeault *et.al.*, 2007). As células da crista neural são altamente migratórias e também são precursoras de outros tipos celulares, incluindo osteócitos, condrócitos, células do Sistema Nervoso (neurônios e células da glia) e células do Sistema Endócrino (glândula tireóide e células cromafins da medula adrenal) (Dupin *et.al.*, 2007; Uong & Zon, 2010).

A função primária dos melanócitos é a síntese de melanina em organelas denominadas melanossomos. Após a síntese de melanina, os melanossomos são transportados para a camada mais superficial da pele e envolvem os queratinócitos (Fang *et.al.*, 2006). A melanina possui diversas funções, tais como a absorção da radiação solar e a neutralização de radicais livres gerados no interior da célula, que são imprescindíveis para a manutenção da integridade celular (Mani *et.al.*, 2001).

O melanoma cutâneo é um tumor de origem neuroectodérmica proveniente da proliferação descontrolada de melanócitos (Gray-Schopfer *et.al.*, 2007). O processo exato que leva à transformação maligna dos melanócitos ainda permanece desconhecido, mas a etiopatogênese do melanoma é atribuída à combinação de predisposição genética e exposição à radiação ultravioleta (Chudvnoski *et.al.*, 2005; Dahl & Guldborg, 2007; Chien *et.al.*, 2009). Acredita-se, que a incidência de raios ultravioleta UVA (320-400 nm) e UVB (290-320 nm) na pele contribua para a geração

de espécies reativas, tais como íons superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\bullet OH$), hipoclorito ($H^{\bullet}OCl$), óxido nítrico (NO) e oxigênio singlete (Palmiere *et.al.*, 2009). Alguns dos compostos gerados ($O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$) possuem alta propensão a reagir com DNA, aminoácidos, proteínas e lipídios de membranas. Os danos ao DNA podem desencadear dois processos celulares: (1) Interrupção do ciclo celular para reparo do DNA ou (2) Apoptose mediada pela proteína supressora tumoral p53. Se ocorrer falha nesses processos, a proliferação celular prossegue, levando à disfunção e à transformação celular (De Gruijl *et. al.*, 2001; Sulaimon & Kitchell, 2003).

Adicionalmente, a homeostasia dos melanócitos é regulada pela interação com os queratinócitos epidérmicos. Os queratinócitos regulam a sobrevivência, diferenciação, proliferação e motilidade dos melanócitos através da comunicação por fatores de crescimento, moléculas de adesão e junções comunicantes (Haass *et.al.*, 2005; Gray-Schopfer *et.al.*, 2007). A desregulação da sinalização intracelular nos melanócitos ocasionada por mutações em genes críticos para a regulação da proliferação, da senescência e da morte celular, permite o escape do forte controle exercido pelos queratinócitos. Conseqüentemente, os melanócitos podem proliferar desreguladamente (Croce, 2008).

O início e a progressão do melanoma são acompanhados por uma série de mudanças histológicas, classificadas em cinco diferentes estágios de acordo com o modelo de Clark: (1) Nevo, lesão benigna caracterizada pelo agrupamento dos melanócitos; (2) Nevo displásico, caracterizado pelo arranjo randômico e descontínuo dos melanócitos; (3) Fase de crescimento radial, com proliferação celular intraepidérmica; (4) Fase de crescimento vertical, na qual os melanócitos penetram através da membrana basal em direção à derme e tecidos subcutâneos; e (5) Metástase,

caracterizada pela dispersão do melanoma para outras áreas da pele e para outros órgãos, tais como fígado, linfonodos, pulmão, ossos e cérebro (Chudvnoski *et.al.*, 2005; Dahl & Guldberg, 2007). Sinais precoces em um nevo que podem sugerir malignidade incluem assimetria, bordas irregulares, variações de cor, diâmetro ≥ 6 mm, aumento de tamanho, prurido e satelitose (Mohr *et.al.*, 2009).

A incidência do melanoma maligno tem aumentado significativamente desde a década de 1960 e se tornado um problema de saúde pública em muitos países (Marquette *et.al.*, 2007; Eberle *et.al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o número de casos de melanoma aumenta mais rapidamente do que qualquer outro tipo de câncer, sendo que 132.000 novos casos de melanoma são diagnosticados por ano no mundo (Gray-Schopfer *et.al.*, 2007; Mueller & Bosserhoff, 2009). Estimativas recentes sugerem que a incidência do melanoma duplica a cada 10-20 anos (Garbe & Leiter, 2009). Apesar de corresponder a menos de 5% dos cânceres de pele diagnosticados, o melanoma é responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (Dahl & Guldberg, 2007).

As medidas terapêuticas atualmente aprovadas para o melanoma maligno incluem a remoção cirúrgica do tumor, a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia. A quimioterapia pode ser realizada com Dacarbazina, Cisplatina, Carmustina, Paclitaxel e Termozolomida (Zitvogel *et.al.*, 2008). A Dacarbazina é o medicamento de primeira escolha utilizado na quimioterapia, contudo, a resposta ao tratamento é de apenas 10 a 20%, com total remissão do tumor em somente 5% dos pacientes. O uso individual dos outros quimioterápicos não resulta em melhores respostas ao tratamento do melanoma, porém a associação destes compostos parece aumentar a resposta ao tratamento. A quimioterapia clássica pode também ser associada com drogas imunoterápicas, tais como Interferon- α (IFN- α) e Interleucina-2 (IL-2). Entretanto, mesmo com a associação

de diversas drogas, o prognóstico de sobrevida média ainda é de somente poucos meses (Parmiani *et.al.*, 2007). Estudos indicam que a ineficácia do tratamento se deve principalmente à alta resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos e radioterápicos (Simon *et.al.*, 2008).

1.2. Imunoterapia e câncer

A descoberta de novas alternativas terapêuticas para o melanoma maligno é de grande importância. Muitos tipos distintos de imunoterapias têm sido testados, no entanto, nenhuma das estratégias propostas foi aprovada para uso clínico até o momento (Gray-Schopfer *et.al.*, 2007). Dentre as alternativas terapêuticas, encontram-se: vacinação com antígenos tumorais, vacinação com células dendríticas, vacinação com imunomoduladores recombinantes (co-estimuladores e citocinas), inibição de transdutores de sinais e terapia anti-angiogênica (Chudvnovski *et.al.*, 2005).

A resposta imune contra tumores é dependente da expressão de antígenos que são reconhecidos como estranhos pelo Sistema Imune. Os antígenos tumorais podem ser classificados como: (1) Antígenos tumor-específicos: derivados de glicolipídios, de glicoproteínas alteradas e de proteínas mutadas (provenientes de genes supressores de tumor e de oncogenes); e (2) Antígenos associados a tumores: antígenos expressos também pelas células normais, mas cuja expressão está alterada nas células tumorais (Abbas *et.al.*, 2003).

O reconhecimento de antígenos expressos em células tumorais pode desencadear dois tipos de respostas anti-tumorais: (1) Resposta Celular, mediada por linfócitos T, macrófagos, células NK e células NKT; e (2) Resposta Humoral, mediada pelos anticorpos secretados pelos linfócitos B. Na Resposta Imune Humoral, os anticorpos

reconhecem os antígenos expressos pelas células tumorais e ocasionam a ativação do Sistema Complemento levando à formação de complexos de ataque à membrana, ao recrutamento de células NK ou de macrófagos, e à citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Anticorpos podem ainda bloquear fatores de crescimento e receptores de fatores de crescimento, inibir a angiogênese ou ter um efeito direto no desencadeamento da apoptose (Scharma *et.al.*, 2006; Reichert & Valge-Archer, 2007; Weiner, 2007).

Na imunoterapia contra o câncer, anticorpos monoclonais (mAbs) são utilizados como ferramentas para diagnóstico, monitoramento e tratamento da doença (Pasqualini & Arap, 2004; Schrama *et.al.*, 2006; Griggs & Zinkewich-Peotti, 2009). O uso de mAbs têm se mostrado mais vantajoso que o uso de terapias convencionais baseadas em compostos químicos. mAbs apresentam farmacocinética e farmacocitotoxicidade favoráveis, desencadeiam poucos efeitos colaterais devido à alta especificidade e afinidade para a doença-alvo e, são capazes de recrutar efetores imunológicos para iniciar a destruição das células-alvo (Chiarella & Fazio, 2008). Até o presente momento, 12 mAbs foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o uso clínico (Tabela 1). Entretanto, nenhum desses mAbs é indicado para o combate do melanoma maligno (Reichert & Valge-Archer, 2007).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados para a terapia contra o câncer. *Modificada de Reichert & Valge-Archer (2007).*

Nome Genérico	Nome Comercial	Descrição	Primeira Indicação	Ano e País
Edrecolomab	Panorex	Murino, IgG2a, anti-EpCAM	Câncer colorretal	1995 (Alemanha)
Rituximab	Rituxan	Quimérico, IgG1 κ , anti-CD20	Linfoma Non-Hodgkin's	1997 (Estados Unidos)
Trastuzumab	Herceptin	Humanizado, IgG1 κ , anti-HER2	Câncer de mama	1998 (Estados Unidos)
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Humanizado, IgG4 κ , anti-CD33	Leucemia mielóide aguda	2000 (Estados Unidos)
Alemtuzumab	Campath	Humanizado, IgG1 κ , anti-CD52	Leucemia linfocítica crônica	2001 (Estados Unidos)
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Murino, IgG1 κ , anti-CD20	Linfoma Non-Hodgkin's	2002 (Estados Unidos)
I-131 ch-TNT	N/A	Quimérico, IgG1 κ , anti-antígenos associados ao DNA	Câncer de pulmão	2003 (China)
I-131 tositumomab	Bexxar	Murino, IgG2a λ , anti-CD20	Linfoma Non-Hodgkin's	2003 (Estados Unidos)
Cetuximab	Erbitux	Quimérico, IgG1 κ , anti-receptor EGF	Câncer colorretal	2003 (Suécia)
Bevacizumab	Avastin	Humanizado, IgG1, anti-VEGF	Câncer colorretal	2004 (Estados Unidos)
Nimotuzumab	TheraCIM	Humanizado, IgG1, anti-receptor EGF	Câncer de cabeça e pescoço	2005 (China)
Panitumumab	Vectibix	Humano, IgG2 κ , anti-receptor EGF	Câncer colorretal	2006 (Estados Unidos)

Para o tratamento do melanoma humano, somente um mAb (mAb R24) apresentou efeitos significativos na regressão tumoral, todavia, também causou efeitos colaterais muito graves, o que impediu sua utilização na clínica. O mAb R24, uma IgG murina não passível de humanização, liga-se especificamente ao gangliosídeo GD3

mediando efeitos de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e de citotoxicidade celular dependente de complemento (CDC). O tratamento de pacientes com esse mAb levou à regressão tumoral em alguns deles, mas também causou efeitos colaterais dose-dependentes (Pukel *et. al.*, 1982; Houghton *et. al.*, 1985; Soiffer *et. al.*, 1997).

Recentemente, ensaios pré-clínicos e clínicos com outros mAbs têm se mostrado promissores. Um mAb anti-CTLA-4 (Ipilimumab: MDX-010), utilizado para reduzir a tolerância imunológica no melanoma, foi testado tanto em monoterapia como em combinação com vacinas, com IL-2 ou com dacarbazina, observando-se efeitos anti-tumorais em 13 a 22% dos pacientes em estágio IV da doença (Weber, 2008). Um mAb humano contra a molécula de adesão MCAM/MUC18 foi testado em ensaios pré-clínicos. Esse mAb não demonstrou efeitos na proliferação da célula de melanoma *in vitro*, no entanto, inibiu significativamente o crescimento de células de melanoma metastático inoculadas subcutaneamente em camundongos *nude*, assim como suprimiu a metástase pulmonar dessas células (Mills *et. al.*, 2002; Melnikova & Bar-Eli, 2006; Zigler *et. al.*, 2008)

Desta forma, estudos para a obtenção de anticorpos monoclonais efetivos contra o melanoma, e a descoberta de novos alvos nesse câncer, são de extrema importância.

Recentemente em nosso laboratório, dois hibridomas secretores de anticorpos monoclonais contra antígenos do melanoma murino B16F10 foram obtidos após imunização de camundongos C57BL/6 singênicos com células do melanoma murino B16F10-Nex4 e o adjuvante hidróxido de alumínio (Alum) (Dobroff *et.al.*, 2002; Dobroff *et.al.*, 2010, em publicação). A sublinhagem B16F10-Nex4 foi selecionada em nosso laboratório a partir da linhagem B16F10. Essas células são cultivadas em meio contendo soro de camundongo normal, que substitui o soro fetal bovino utilizado nos

cultivos regulares, e desta forma elimina-se a presença de contaminantes protéicos de origem bovina nas imunizações, que são altamente imunogênicos.

Um dos hibridomas secreta uma IgM, denominada mAb A4M, que reconhece histona-1 no núcleo da célula B16F10, e surpreendentemente, embora não apresente citotoxicidade *in vitro*, esse mAb reduziu significativamente o número de nódulos pulmonares em camundongos C57Bl/6 inoculados intravenosamente com células B16F10-Nex2 (Dobroff *et.al.*, 2010, em publicação).

O outro hibridoma isolado secreta uma IgG2ak, denominada mAb A4, que apresentou reatividade com células B16F10-Nex2 em ensaio de ELISA-Q e atividade citotóxica *in vitro* contra essa linhagem celular. A atividade citotóxica do mAb A4 foi independente do complemento, porém, aumentada pelo mesmo (Dobroff *et.al.*, 2002).

O efeito protetor do mAb A4 contra o melanoma murino foi verificado *in vivo* com a redução do desenvolvimento tumoral subcutâneo e pulmonar, aumentando significativamente a sobrevida dos animais. A proteína reconhecida pelo mAb A4 foi purificada em coluna de afinidade a partir do lisado da célula B16F10-Nex2, analisada por espectrometria de massa e identificada como Protocaderina β 13 (PCDH β 13) murina, uma proteína de função desconhecida, mas provavelmente relacionada à interação intercelular e à sinalização intracelular (Morishita & Yagi, 2007). A interação do mAb A4 com células de melanoma murino *in vitro* levou à algumas alterações sugestivas de apoptose, como exposição de fosfatidilserina e degradação de DNA em fragmentos múltiplos de 200 pares de bases, característico da ativação de endonucleases que ocorre durante a apoptose (Taylor *et.al.*, 2008). Esse mAb também foi citotóxico para células de melanoma humano (Dobroff *et.al.*, 2010, em publicação).

1.3. Anticorpos e regiões determinantes de complementariedade (CDRs)

A estrutura básica de uma molécula de anticorpo consiste em duas cadeias leves idênticas unidas a duas cadeias pesadas idênticas através de ligações dissulfeto. A cadeia leve possui uma região variável (V_L) e uma região constante (C_L). A cadeia pesada possui uma região variável (V_H) e de três a quatro regiões constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}). Em cada anticorpo existem seis regiões hipervariáveis denominadas Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs), localizadas na região de ligação ao antígeno, sendo três na cadeia leve (CDR L) e três na cadeia pesada (CDR H) (Abbas *et.al.*, 2003). O papel dessas seqüências é de se ligar ao antígeno com alta afinidade e especificidade. Pela sua localização, o CDR H3 é crucial na interação com o antígeno, sendo basicamente a região que determina a especificidade do anticorpo (Shirai *et. al.*, 1999; López-Requena *et. al.*, 2007). Em alguns casos, peptídeos sintéticos relativos a essa região competem com o anticorpo pela sua ligação ao antígeno, reproduzindo funcionalmente as propriedades do anticorpo. Peptídeos ciclizados, sintetizados com cisteínas nas regiões amino e carboxiterminal, apresentam ainda maior similaridade funcional com o anticorpo, e por esse motivo, são denominados *microantibodies* (Levi *et. al.*, 1993).

O peptídeo referente à região CDR H3 do mAb A4 (A4 H3) apresentou os mesmos efeitos do mAb A4 sobre células de melanoma murino B16F10-Nex2 *in vitro*. Observou-se também, como esperado, que o peptídeo cíclico (cA4 H3) apresentou maior atividade inibitória do mAb A4 do que o peptídeo linear, sugerindo que esse peptídeo apresenta a mesma especificidade e atividade que o mAb A4 (Dobroff *et. al.*, 2010, em publicação).

1.4. Protocaderinas

Utilizando-se uma coluna de afinidade com o mAb A4, o alvo desse mAb na superfície da célula de melanoma murino B16F10-Nex2 foi isolado e identificado como Protocaderina β 13 (PCDH β 13) (Dobroff *et.al.*, 2010, em publicação).

As protocaderinas constituem a maior família de proteínas pertencentes à superfamília das caderinas, moléculas originalmente descritas como proteínas de adesão celular dependentes de cálcio. As protocaderinas são predominantemente expressas no tecido nervoso e a grande quantidade e diversidade dos membros da família das protocaderinas sugerem que as mesmas podem participar de uma grande variedade de processos biológicos, tais como reconhecimento celular, sinalização intracelular e formação de redes neurais (Pla *et.al.*, 2001; Morishita & Yagi, 2007; Yagi, 2008).

As protocaderinas são divididas em dois grupos de acordo com sua estrutura genômica, as protocaderinas clusterizadas (58 representantes) e as não-clusterizadas (13 representantes). As protocaderinas clusterizadas são divididas em três subgrupos, denominados PCDH α , PCDH β e PCDH γ , e as protocaderinas não-clusterizadas podem ser divididas em dois subgrupos, PCDH δ e protocaderinas solitárias na árvore filogenética (Yagi, 2008).

As protocaderinas são proteínas transmembrana caracterizadas por apresentarem na região extracelular de seis a sete motivos caderina, e regiões citoplasmáticas altamente variáveis que não apresentam homologia significativa com as regiões citoplasmáticas das caderinas clássicas (Suzuki, 2000; Vanhalst *et.al.*, 2001). O motivo caderina possui 110 aminoácidos e é tridimensionalmente similar ao motivo imunoglobulina; entretanto, não existe nenhum resíduo conservado entre ambos os motivos. Outra similaridade com as imunoglobulinas e com o receptor e antígenos do

linfócito T (TCR) é revelada pela organização gênica. Wu e colaboradores (2001) sugeriram os termos “região variável” e “região constante” para descrever a organização dos segmentos gênicos das protocaderinas. A região variável é composta por múltiplos segmentos gênicos, desprovidos de íntrons e organizados em *tandem*, que codificam três regiões: extracelular, transmembrana e uma parte da região citoplasmática. A região constante é composta por segmentos gênicos codificadores da região citoplasmática, compartilhada dentre as protocaderinas. Durante o processamento do mRNA, os éxons da região variável sofrem *splicing* alternativo em relação à região constante, gerando inúmeras isoformas com variadas seqüências no domínio extracelular (Miki *et.al.*, 2005; Morishita & Yagi, 2007).

A família PCDH β é composta por genes que possuem somente um éxon e não possuem a região constante. Todas as proteínas PCDH β são altamente similares entre si (Wu *et.al.*, 2001). Os motivos extracelulares EC1, EC2 e EC3 apresentam os menores níveis de similaridade entre as diferentes PCDH β , enquanto EC4, EC5 e EC6 são altamente conservadas. Da mesma forma, as regiões transmembrana e citoplasmática são altamente conservadas, exceto pelos 20 últimos resíduos de aminoácidos na região carboxiterminal, que conferem distintas atividades sinalizadoras para as diferentes PCDH β (Vanhalst *et.al.*, 2001).

Protocaderinas têm atividade Ca²⁺-dependente e, ao contrário das caderinas clássicas, a principal função das protocaderinas parece não estar relacionada à adesão intercelular, mas à determinação de especificidade na interação célula-célula através de interações homofílicas e à transdução de sinais através de interações com distintas proteínas citoplasmáticas (Suzuki, 2000; Gruss *et.al.*, 2001; Morishita & Yagi, 2007). As principais funções de cada isoforma ainda não foram determinadas (Imoto *et.al.*, 2006).

A inativação ou a superexpressão de algumas protocaderinas já foram relacionadas à carcinogênese de vários tumores, funcionando em alguns tumores como oncogenes e em outros como supressores de tumor. Apesar de não terem sido encontrados sítios de ligação para β -catenina nas moléculas de protocaderina (Morishita & Yagi, 2007), muitos autores têm relatado que essas moléculas sinalizam pela via β -catenina em diferentes tipos tumorais. A seguir, descrevemos alguns resultados onde o papel de protocaderinas na carcinogênese é relatado.

Yu e colaboradores (2008) demonstraram que protocaderina 8 (PCDH8), o ortólogo humano de PAPC (*paraxial protocadherin*), está inativada por mutação ou silenciamento epigenético em carcinomas de mama. A perda da expressão de PCDH8 foi associada à perda de heterozigose, metilação parcial do promotor e proliferação aumentada, sugerindo que esse gene seja um importante supressor de tumor.

Já foi demonstrado que PCDH10 também é um gene supressor de tumor, e seu silenciamento por hipermetilação do promotor do gene foi observado em tumor de mama humano (Miyamoto *et.al.*, 2005), variados carcinomas (Ying *et.al.*, 2006), diversos cânceres hematológicos (Ying *et.al.*, 2007), câncer gástrico (Yu *et.al.*, 2009; Yu *et.al.*, 2010), câncer cervical (Narayan *et.al.*, 2009; Wang *et.al.*, 2009), e câncer colorretal e pancreático (Yu *et.al.*, 2010). Frequentemente, a desmetilação do promotor com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina reverte características tumorais dessas células em ensaios *in vitro*.

Imoto e colaboradores (2006) demonstraram que o silenciamento epigenético por hipermetilação da região rica em CpG do promotor do gene PCDH20 levou à perda de função do mesmo em 20 linhagens celulares primárias de NSCLC (*non-small cell lung cancer*), e foi relacionado com uma sobrevida mais curta dos pacientes. A restauração da expressão da PCDH20 reduziu características tumorais das linhagens *in*

vitro. Esses resultados sugerem que PCDH20 é um gene supressor de tumor em câncer de pulmão, podendo estar relacionado à carcinogênese desse tipo tumoral. O mesmo efeito foi observado com relação ao gene da PCDH17 no carcinoma de células escamosas de esôfago (Haruki *et.al.*, 2010).

A expressão de PCDH24 também foi implicada na supressão tumoral, estando envolvida na inibição por contato celular e no crescimento dependente de ancoragem, características que uma célula tumoral perde ao ser transformada. Okazaki e colaboradores (2002) clonaram e identificaram o gene de PCDH24 humana e demonstraram que a superexpressão da PCDH24 em células de carcinoma de cólon HCT-116 re-introduziu na linhagem algumas características encontradas em células não tumorais, como a inibição da proliferação por contato celular e o crescimento em camada única e não mais em múltiplas camadas, inibindo também o crescimento do tumor em camundongos *nude*. Ose e colaboradores (2009) demonstraram que os efeitos da superexpressão da PCDH24 estão relacionados à sinalização intracelular por β -catenina, que passa a ficar localizada na região submembranar sem acesso ao núcleo, levando à diminuição da expressão de moléculas como CD44 e E-caderina (relacionadas à adesão celular), e PCNA, ciclina D1 e Myc (relacionadas ao controle do ciclo celular), sugerindo que a supressão da sinalização de β -catenina por PCDH24 leva à inibição do crescimento por contato. A função desse gene ainda não é totalmente conhecida, e recentemente, foi demonstrado que PCDH24 se localiza em junções aderentes na região apical da membrana de células epiteliais, não é redistribuída após remoção de cálcio, e tem baixa taxa de reciclagem, sugerindo que a molécula esteja envolvida no estabelecimento da polaridade da célula epitelial (Krahn *et. al.*, 2010).

Yang e colaboradores (2005) relataram que células de câncer de próstata (LNCaP) que crescem na ausência de hormônios e são resistentes à apoptose expressam

uma protocaderina denominada PCDH-PC, identificada como um oncogene presente no cromossomo Y humano. A PCDH-PC é uma proteína de localização citoplasmática que possui um domínio carboxiterminal homólogo ao sítio de ligação de β -catenina das caderinas clássicas. A superexpressão da PCDH-PC nessas células induziu a sinalização intracelular pela via Wnt/ β -catenina e ocasionou a transdiferenciação dessas células para um tipo neuroendócrino-*like*, semelhante ao observado nessas células quando cultivadas em meio sem estímulo androgênico. A expressão da PCDH-PC em câncer de próstata humano pode explicar o motivo pelo qual a proliferação de tais células seja independente de hormônios. Observou-se que a quantidade do mRNA do gene PCDH-PC está aumentada em células de carcinoma de próstata resistentes ao hormônio, comparativamente à células prostáticas normais e células tumorais do mesmo tecido sensíveis à ação de hormônios androgênicos, corroborando os resultados observados em linhagens tumorais estabelecidas (Terry *et. al.*, 2006).

Parenti e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento de células de câncer colorretal com o anti-inflamatório ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, Mesalazine[®]), um forte candidato a ser utilizado na prevenção desse tipo de câncer, induziu a expressão de μ -protocaderina, que seqüestrou β -catenina na membrana plasmática impedindo sua função como proteína co-ativadora da transcrição. Conseqüentemente, observou-se redução da proliferação celular, aumento do número de células em apoptose e reparo do DNA.

Dalosso e colaboradores (2009) demonstraram que a maioria dos genes dos *clusters Pcdha*, *Pcdh β* e *Pcdhy* estão hipermetilados e possuem expressão reduzida no tumor de Wilm's, um tumor renal pediátrico. O silenciamento de alguns genes *Pcdhy* ocasionou o aumento dos níveis de β -catenina e o aumento da indução de seus genes-alvos. Corroborando esse resultado, a superexpressão de alguns genes *Pcdhy* suprimiu a

atividade da β -catenina e inibiu a formação de colônias e o crescimento independente de ancoragem, sugerindo que os genes *Pcdh* funcionem como supressores tumorais nesse tumor.

Junghans e colaboradores (2008) analisaram a expressão de diversas PCDH β no Sistema Nervoso Central de camundongos adultos e verificaram que a PCDH β 13 é expressa em altos níveis em múltiplas regiões, incluindo a retina, a medula espinhal, o córtex, o cerebelo, o hipocampo e o bulbo olfatório. A PCDH β 13 começa a ser fracamente expressa na medula espinhal e no cérebro a partir do dia embrionário 10,5, momento no qual se inicia a neurogênese e o aparecimento dos primeiros neurônios. A expressão da PCDH β 13 aumenta significativamente no dia embrionário 12,5 e mantém-se praticamente constante durante o desenvolvimento embrionário. A expressão da PCDH β 13 foi também observada no Sistema Nervoso Periférico e em tecidos não relacionados ao Sistema Nervoso durante a embriogênese e em camundongos adultos. O único órgão que não expressa nenhuma PCDH β é o fígado.

A estrutura da PCDH β 13 murina é representada na Figura 1. A PCDH β 13 possui um peptídeo sinal aminoterminal com 28 aminoácidos; seis motivos caderina na região extracelular que variam de 73 a 86 aminoácidos; uma região transmembrana de 23 aminoácidos; e uma região citoplasmática carboxiterminal com 86 aminoácidos.

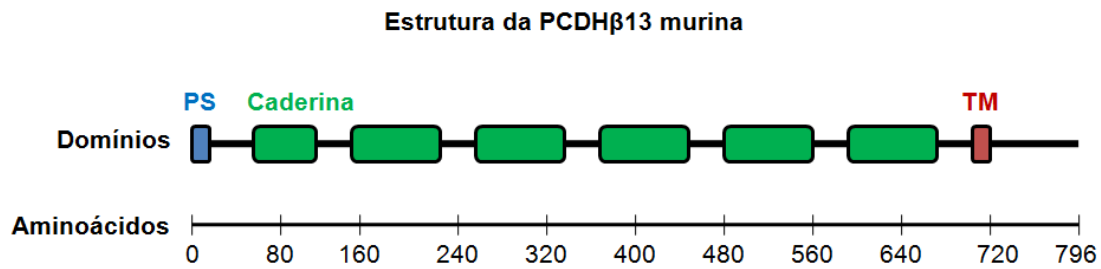


Figura 1. Estrutura da PCDHβ13 murina. A PCDHβ13 murina possui um peptídeo sinal (PS), seis motivos caderina, uma região transmembrana (TM) e uma região citoplasmática carboxiterminal. A estrutura da PCDHβ13 humana é semelhante à da PCDHβ13 murina. *Modificada de Unigene* (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q91Y06>).

1.5. Apoptose e sinalização intracelular

O reconhecimento da PCDHβ13 na célula B16F10-Nex2 pelo mAb A4 leva a célula à morte *in vitro*. A exposição de fosfatidilserina na membrana e a fragmentação do DNA por endonucleases sugerem que essa interação induza um processo apoptótico na célula tumoral (Dobroff *et. al.*, 2010, em publicação).

A apoptose é um importante processo celular envolvido no desenvolvimento e homeostasia dos metazoários. A apoptose ocorre durante a embriogênese, desenvolvimento do sistema imune, resolução de respostas imunes, em resposta a danos no DNA, durante a privação de fatores de crescimento e para manter a homeostasia tecidual (Degterev & Yuan, 2008). A desregulação da apoptose pode ocasionar uma grande variedade de patologias, incluindo câncer, doenças auto-imunes e doenças neurodegenerativas (Riedl & Shi, 2004).

Durante a apoptose ocorrem várias alterações celulares, caracterizadas por modificações morfológicas e bioquímicas. As principais alterações incluem perda da aderência à matriz extracelular e às células vizinhas, ocasionando arredondamento celular e retração de pseudópodes; diminuição do volume celular e nuclear;

condensação da cromatina; fragmentação do DNA; pouca ou nenhuma alteração na ultraestrutura de organelas citoplasmáticas (complexo de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias e citoesqueleto); externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática; formação de corpos apoptóticos; e engolfamento por fagócitos residentes (*in vivo*) (Degterev & Yuan, 2008; Taylor *et.al.*, 2008; Kroemer *et.al.*, 2009).

O controle do ciclo celular em organismos multicelulares é realizado por uma complexa rede de vias de sinalização que, dependendo do estímulo, determinam se ocorrerá proliferação ou morte celular.

Dentre as vias de sinalização que podem estar envolvidas na interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 encontram-se vias apoptóticas que podem ter sido ativadas (caspases recrutadas pelas vias intrínseca ou extrínseca) e/ou vias proliferativas que podem ter sido inibidas (MAPK, PI3K/AKT e Wnt/ β -catenina). A seguir, descrevemos o processo de ativação da via das caspases e da via Wnt/ β -catenina, implicada na sinalização induzida por protocaderinas em algumas células tumorais.

1.5.1. Via das Caspases

Caspases (*cysteine aspartic acid-specific proteases*) são proteases altamente específicas que clivam os substratos após o motivo tetrapeptídico P4-P3-P2-P1, no qual P1 é um resíduo aspartato. A família das caspases pode ser subdividida em iniciadoras (que são capazes de se auto-ativarem e iniciar o processamento proteolítico de outras caspases) e efetoras (que são ativadas por outras caspases). As caspases efetoras clivam um grande número de substratos durante a apoptose, incluindo endonucleases e enzimas de reparo do DNA (Taylor *et.al.*, 2008).

As caspases estão normalmente presentes em células sadias como precursores inativos (zimógenos) com pouca ou nenhuma atividade proteolítica. Os estímulos apoptóticos podem induzir a ativação de caspases através de três vias principais: (1) Intrínseca; (2) Extrínseca; e (3) Via Granzima B. Independentemente da via de ativação de caspases, todas as vias levam à ativação das principais caspases efetoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7) (Taylor *et.al.*, 2008).

A via intrínseca é ativada por uma variedade de estímulos gerados no interior celular, tais como ativação de oncogenes e danos ao DNA (Riedl & Shi, 2004). Esses estímulos ativam um ou mais membros da subfamília *BH3-only proteins* (BAD, BID, BIK, BMF, BIM, HRK, NOXA e PUMA), que são proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2. A regulação dos membros da família *BH3-only proteins* ocorre de distintas maneiras. Danos ao DNA ativam a proteína supressora tumoral p53, que por sua vez, aumenta a síntese de NOXA e PUMA. A ausência de fatores de crescimento induz a ativação de BAD e de BIM. As proteínas BIM e BMF estão relacionadas aos microtúbulos e filamentos de actina, respectivamente. BID é ativada através de proteólise por caspase-8 (Taylor *et.al.*, 2008). A ativação de membros da subfamília *BH3-only proteins* antagoniza a ação das proteínas anti-apoptóticas da mesma família (BCL-2, BCL-x_L, MCL1, BCL2A1, BCL-W e BCL-B) e promove a oligomerização das proteínas BAK-BAX na membrana externa mitocondrial. A formação desses oligômeros permite o efluxo de proteínas do espaço intermembranas da mitocôndria (citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF, EndoG e OMI/HTRA2) para o citosol. O citocromo c liberado associa-se ao APAF-1 e a pró-caspase-9 formando um complexo multiprotéico, o apoptosomo, que é ativado pelo ATP com conseqüente ativação da caspase-9, desencadeando a cascata de sinalização pelas caspases-3, -6 e -7 (Sulaimon & Kitchell, 2003; Riedl & Shi, 2004; Eberle *et.al.*, 2008).

A via extrínseca é ativada pelo reconhecimento de um ligante de morte extracelular (FasL ou TNF α , por exemplo) por seu receptor de morte transmembrana (Fas ou TNFR, por exemplo). O reconhecimento induz o recrutamento de FADD e da caspase-8, levando à formação de um complexo denominado DISC. A formação do complexo DISC induz a ativação das caspases-8 e -10 que, por sua vez, desencadeiam a cascata de sinalização pelas caspases-3, -6 e -7. Em algumas situações, a caspase-8 pode desencadear a via intrínseca através da ativação de BID, uma *BH3-only protein* (Eberle *et.al.*, 2008).

A via dependente de granzima B ocorre durante a resposta imune e envolve a participação de linfócitos T CD8⁺ ou células NK. Quando ocorre o reconhecimento da célula-alvo, essas células liberam grânulos especializados contendo granzima B e perforina. A perforina oligomeriza na membrana plasmática da célula-alvo e forma poros que permitem a entrada das granzimas. A granzima B pode ativar BID e as caspases-3 e -7 (Taylor *et.al.*, 2008).

Um esquema das vias de ativação das caspases está representado na Figura 2.

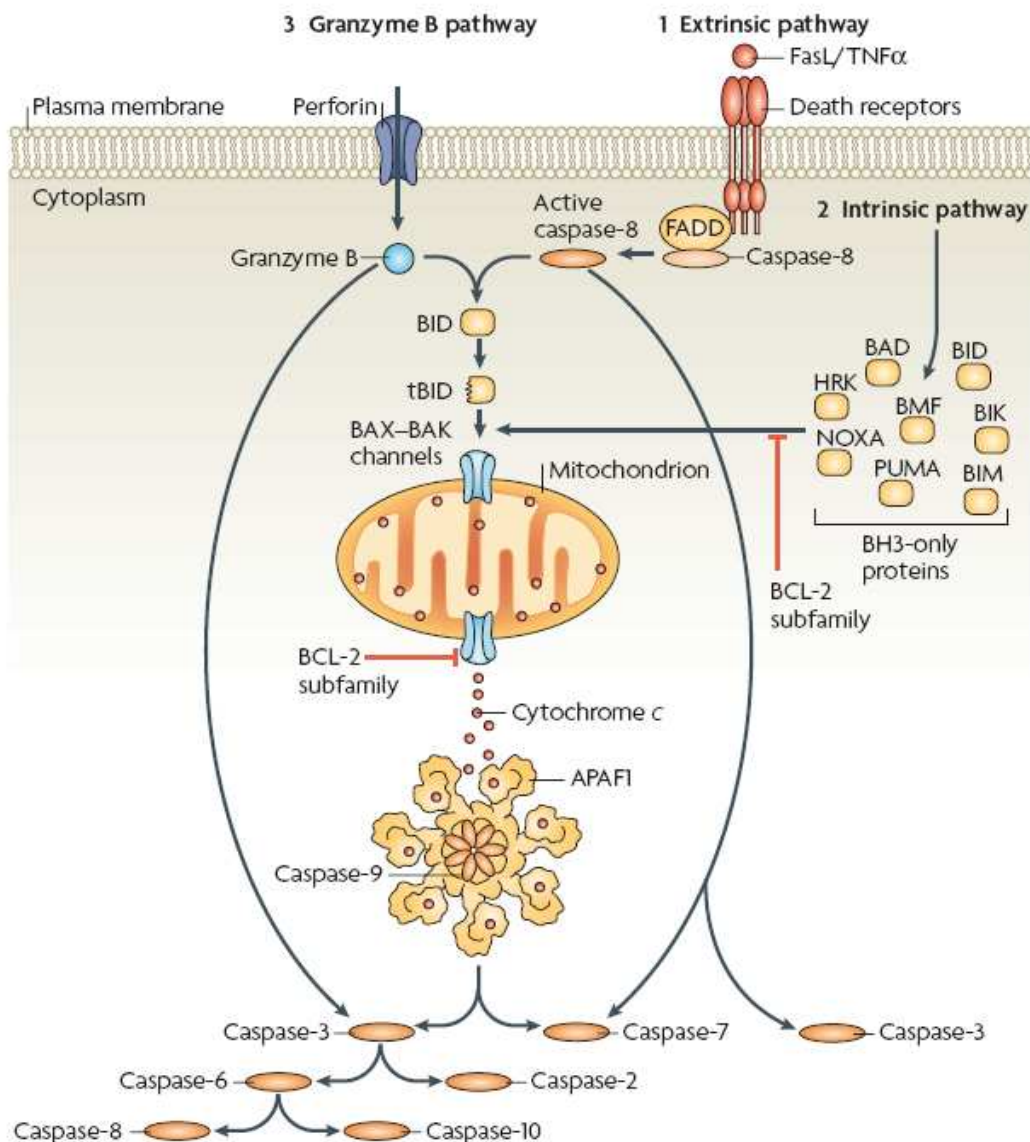


Figura 2. Vias de ativação das caspases. 1) Via extrínseca. O reconhecimento de um ligante de morte por seu receptor transmembrana induz o recrutamento de FADD e da caspase-8, com conseqüente ativação das caspases-8, -3, -6 e -7. 2) Via intrínseca. Estímulos de estresse gerados no interior celular ativam membros da subfamília *BH3-only proteins* que antagonizam a ação das proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 e promovem a oligomerização das BAK-BAX na membrana externa mitocondrial. Há liberação de proteínas mitocondriais para o citosol. O citocromo c induz a formação do apoptosomo, com conseqüente ativação das caspases-9, -3, -6 e -7. 3) Via da granzima B. Linfócitos T CD8⁺ ou células NK liberam grânulos especializados contendo granzima B e perforina. A perforina oligomeriza na membrana plasmática da célula-alvo e forma poros que permitem a entrada das granzimas. A granzima B pode ativar BID e as caspases-3 e -7. *Modificada de Taylor et.al., 2008.*

A pronunciada resistência do melanoma à quimioterapia é sugestiva da inativação de programas de apoptose, um pré-requisito para a proliferação celular (Eberle *et.al.*, 2008). A indução de apoptose é um dos alvos terapêuticos almejados pelas terapias anti-tumorais (Chin *et.al.*, 2007).

1.5.2. Via Wnt/ β -catenina

1.5.2.1. Via Canônica: ativação de TCF/LEF

Os genes *Wnt* codificam uma família de 19 glicoproteínas secretadas que atuam como ligantes na ativação de vias de sinalização receptor-dependente. A bem conhecida via de sinalização intracelular por Wnt/ β -catenina inibe a degradação da β -catenina, levando a seu acúmulo no núcleo celular e à regulação da expressão de genes-alvo que controlam uma grande variedade de funções celulares, como diferenciação, proliferação e motilidade (Chien *et.al.*, 2009). A concentração de β -catenina livre é finamente regulada por um processo de degradação mediada pelo proteassomo. Na ausência da ligação de um fator Wnt ao seu receptor transmembrana Frizzled e ao seu co-receptor LRP5/6, um complexo formado pelas proteínas GSK3 β , APC, Axina e CK-1 α promove a fosforilação da β -catenina, ocasionando sua ubiquitinação por β -TrCP (uma E3 ubiquitina ligase) e degradação pelo proteassomo. Os baixos níveis de β -catenina citoplasmática garantem a repressão transcricional através da ligação do co-repressor Groucho aos fatores de transcrição TCF/LEF (Klaus & Birchmeier, 2008).

Ao contrário, na presença do fator Wnt, os co-receptores LRP5/6 são fosforilados por CK-1 γ e por GSK3 β , e proteínas Dishevelled são recrutadas para a membrana plasmática e interagem com o receptor Frizzled. A interação da axina com

LRP5/6 e proteínas Dishevelled leva à inativação do complexo GSK3 β -APC-Axina-CK-1 α através da fosforilação de GSK3 β , ocasionando a estabilização da β -catenina e sua translocação para o núcleo. No núcleo, a β -catenina desloca o co-repressor Groucho e forma um complexo de transcrição ativo com os fatores de transcrição TCF/LEF através da interação com as proteínas co-ativadoras da transcrição Pygo, BCL9 e CBP. Conseqüentemente, ocorre a transcrição de vários genes relacionados à proliferação celular (Dahl & Guldborg, 2007; Klaus & Birchmeier, 2008). Um esquema da sinalização pela via canônica de Wnt/ β -catenina está representado na Figura 3.

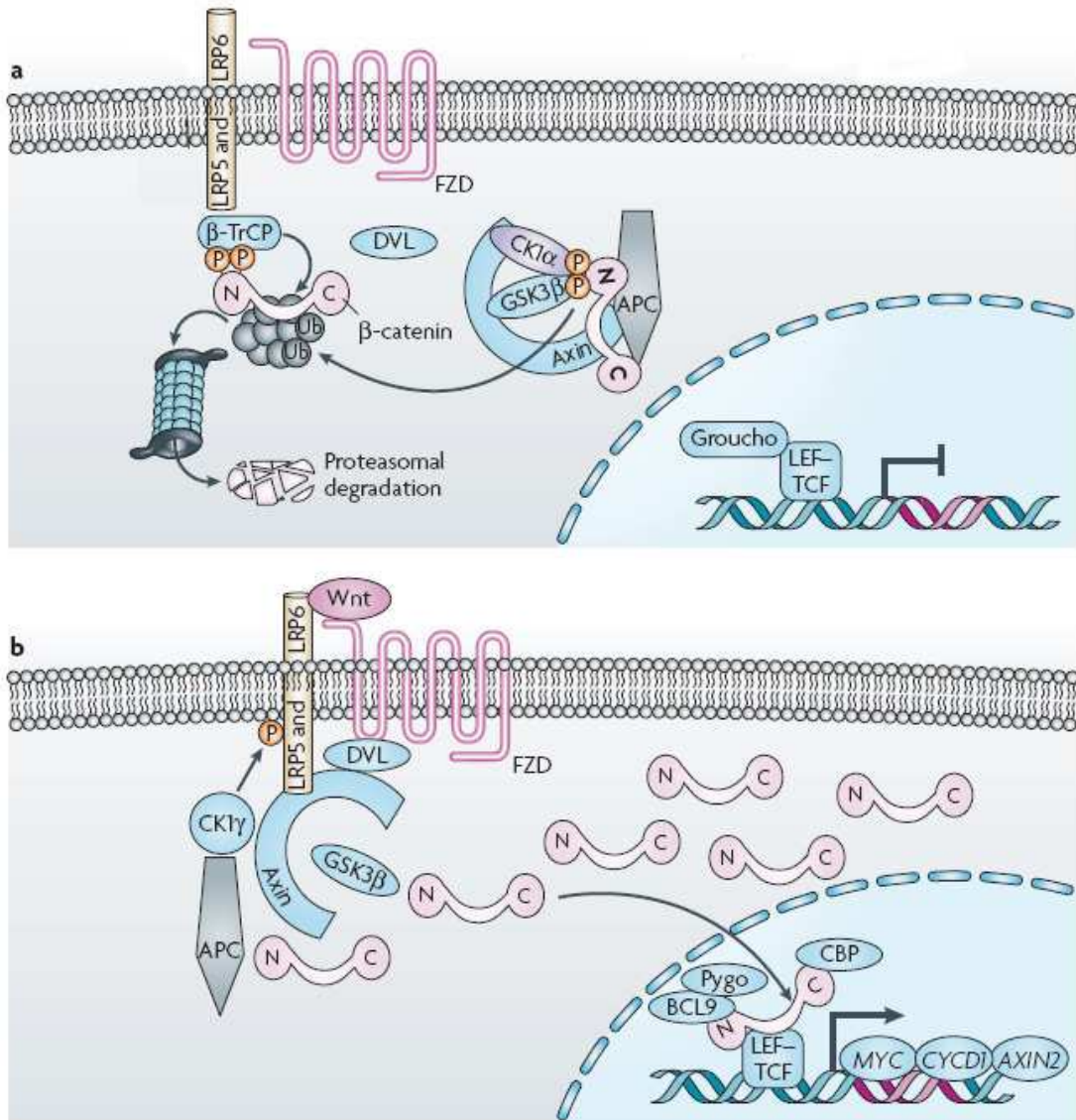


Figura 3. Via canônica de sinalização Wnt/β-catenina. **A)** Na ausência da ligação de Wnt ao seu receptor Frizzled (FZD) e ao seu co-receptor LRP5/6, o complexo formado pelas proteínas GSK3β, APC, Axina e CK-1α promove a fosforilação da β-catenina, ocasionando sua ubiquitinação por β-TrCP e degradação pelo proteassomo. Ocorre repressão transcricional através da ligação do co-repressor Groucho aos fatores de transcrição TCF/LEF. **B)** Na presença de Wnt, LRP5/6 são fosforilados por CK-1γ e por GSK3β, e proteínas Dishevelled (DVL) são recrutadas e interagem com FZD. A interação da axina com LRP5/6 e DVL inativa o complexo GSK3β-APC-Axina-CK-1α, ocasionando a estabilização da β-catenina e sua translocação para o núcleo. No núcleo, a β-catenina desloca Groucho e forma um complexo de transcrição ativo com TCF/LEF através da interação com as proteínas co-ativadoras da transcrição Pygo, BCL9 e CBP. *Modificada de Klaus & Birchmeier, 2008.*

1.5.2.2. Via não-canônica: ativação de FOXO

Forkhead box O (FOXO) são fatores de transcrição que pertencem à família *Forkhead box*, caracterizada pela presença de um domínio de ligação ao DNA de 100 aminoácidos conservados. Em mamíferos, quatro subfamílias foram identificadas: FOXO1 (expressa no tecido adiposo), FOXO3 (expressa no cérebro, coração, rim e baço), FOXO4 (expressa no músculo esquelético) e FOXO6 (expressa no cérebro) (Burgering, 2008).

Os fatores de transcrição FOXO são regulados por uma grande variedade de estímulos, incluindo insulina, fatores de crescimento, neurotrofinas, nutrientes, citocinas e estresse oxidativo. As funções de FOXO estão relacionadas à parada do ciclo celular, ao reparo do DNA, à detoxificação de espécies reativas de oxigênio, à apoptose e à autofagia. A regulação da atividade de FOXO é realizada através de modificações pós-traducionais, tais como, fosforilação, acetilação e ubiquitinação. FOXOs estão desregulados em vários tipos de cânceres, incluindo câncer de mama, câncer de próstata, glioblastoma e leucemia (Calnan & Brunet, 2008).

Os fatores de transcrição FOXO foram originalmente descritos como proteínas negativamente reguladas na via de sinalização insulina-PI3K-AKT. Na ausência de insulina ou de fatores de crescimento, FOXO localiza-se principalmente no núcleo e promove a transcrição de genes relacionados à parada do ciclo celular, à resistência ao estresse e à promoção de apoptose. Na presença de insulina, FOXO é exportado do núcleo ao citoplasma através da sua fosforilação por AKT e SGK e da participação da proteína 14-3-3. Desta forma, FOXO controla o crescimento celular, desenvolvimento, metabolismo e longevidade (Jin *et.al.*, 2008).

Recentemente, foi também descrita a interação entre FOXO e a proteína β -catenina. Essa interação ocorre em condições de estresse oxidativo e promove a ativação de FOXO. Adicionalmente, FOXO compete com TCF/LEF pela β -catenina, promovendo a inibição da transcrição por TCF/LEF (Jin *et.al.*, 2008). Um esquema representativo da ativação de FOXO por β -catenina e a competição com o fator TCF/LEF é mostrado na Figura 4.

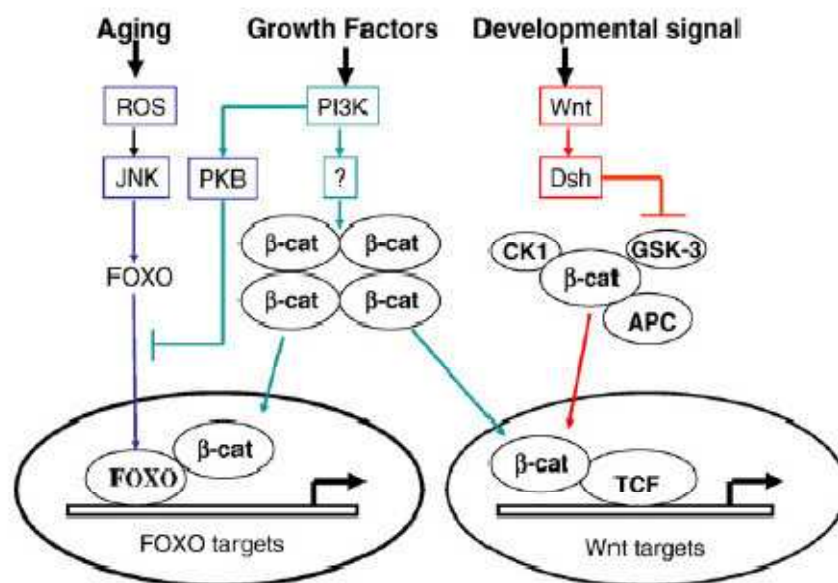


Figura 4. Via de sinalização de β -catenina por FOXO e competição com o fator TCF/LEF. Os fatores de transcrição TCF/LEF e FOXO competem por β -catenina. Fatores de crescimento e estresse oxidativo controlam esse balanço. Durante o envelhecimento, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocasiona a ativação da transcrição mediada por FOXO e a diminuição da transcrição mediada por TCF/LEF. Fatores de crescimento e estímulos de desenvolvimento estimulam a exclusão nuclear de FOXO através de sua fosforilação por AKT (PKB) e promovem a ligação da β -catenina aos fatores de transcrição TCF/LEF. *Modificada de Jin (2008).*

1.5.2.3. β -catenina e complexos de adesão celular

Junções aderentes são complexos de adesão celular compostos por E-caderina, β -catenina, α -catenina, e p120-catenina. O mecanismo que regula o balanço entre β -catenina citosólica e β -catenina presente nas junções aderentes é baseado em fosforilação sítio-específica. A fosforilação das tirosinas 142 e 654 na primeira e última repetição *armadillo* da β -catenina impedem a interação da β -catenina com E-caderina e α -catenina, respectivamente, e desfazem a junção aderente. Conseqüentemente, há aumento da transcrição gênica mediada por β -catenina. Esse mecanismo explica como a perda de adesão celular pode estar relacionada à progressão tumoral (Lai *et.al.*, 2009).

1.5.2.4. β -catenina e melanoma

A sinalização anômala pela via da β -catenina pode levar ao desenvolvimento e progressão tumoral (Haass *et.al.*, 2004; Chin *et.al.*, 2007).

Ao contrário do que ocorre para os carcinomas de mama, rim e colorretal, a perda da sinalização pela via Wnt/ β -catenina está relacionada ao desenvolvimento e progressão do melanoma maligno em pacientes e no modelo de melanoma murino B16-F1 (Bachmann *et. al.*, 2005; Chien *et. al.*, 2009). Corroborando esse achado, mutações que ativam constitutivamente a via da β -catenina são raramente encontradas em melanoma (Pollock & Hayward, 2002; Worm *et. al.*, 2004).

Takahashi e colaboradores (2008) demonstraram que o silenciamento gênico da β -catenina no melanoma murino B16-BL6 retardou o crescimento tumoral no modelo subcutâneo, mas promoveu a formação de metástases pulmonares. Os autores mostram

que o silenciamento gênico da β -catenina ocasionou o rearranjo de complexos de adesão celular, favorecendo a migração celular.

Bellei e colaboradores (2008) demonstraram que a inibição de GSK3- β ocasionou o aumento da β -catenina e promoveu a melanogênese no melanoma murino B16F10 e em melanócitos humanos normais. Observou-se a indução de marcadores associados à diferenciação de melanócitos, tais como síntese de melanina, atividade tirosinase, e expressão de tirosinase e MITF. Adicionalmente, houve redução do crescimento tumoral, sugerindo que a diminuição da β -catenina possa estar relacionada ao fenótipo tumoral de células de melanoma.

A maioria dos nevos benignos apresenta β -catenina nuclear, enquanto a perda de β -catenina nuclear é observada na progressão do melanoma (Kageshita *et. al.*, 2001; Maelandsmo *et. al.*, 2003; Bachmann *et. al.*, 2005). Chien e colaboradores (2009) demonstraram que níveis elevados de β -catenina nuclear correlacionam-se com menor proliferação das células *in vivo* e a uma sobrevida maior em pacientes com melanoma.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinação do mecanismo de citotoxicidade envolvido no reconhecimento da Protocaderina β 13 (PCDH β 13) pelo anticorpo monoclonal A4 (mAb A4) em linhagens tumorais murinas e humanas.

2.2. Específicos

2.2.1. Verificar a reatividade e a citotoxicidade do mAb A4 em diferentes linhagens tumorais humanas e correlacionar esse efeito com a expressão da PCDH β 13.

2.2.2. Determinar o mecanismo de morte celular induzido pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 em células tumorais de melanoma murino B16F10-Nex2.1 e de melanoma humano A2058.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos Balb/c fêmeas (a partir de doze semanas) foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos em isoladores com água, ração e serragem autoclavadas, em biotério com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética para Experimentação Animal da UNIFESP (CEP 1115/08, Anexo I).

3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo

A linhagem de melanoma murino B16 foi isolada de um melanoma espontâneo em camundongos C57Bl/6 (H-2^b). Fidler (1975) obteve linhagens de B16 gradativamente mais agressivas e invasivas após sucessivas passagens *in vivo*, nomeando-as de F1 a F10. A linhagem B16F10 foi obtida do Instituto Ludwig de Pesquisas Contra o Câncer – São Paulo. Na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX) foram isoladas sublinhagens da linhagem B16F10 (nomeadas de B16F10-Nex1 a Nex6), que apresentam diferentes graus de imunogenicidade e agressividade. A sublinhagem melanótica B16F10-Nex2 apresenta características próximas à linhagem B16F10, possuindo baixa imunogenicidade e moderada agressividade. A linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 utilizada neste trabalho é o resultado de uma passagem subcutânea *in vivo* da linhagem B16F10-Nex2 e possui as mesmas características que a original, tanto *in vitro* como *in vivo*.

O hibridoma secretor do mAb A4 foi isolado após imunização de camundongos C57Bl/6 com células do melanoma murino B16F10-Nex4 (cultivadas na presença de soro de camundongo) associadas ao adjuvante hidróxido de alumínio (Dobroff *et.al.*, 2002).

O hibridoma secretor do mAb A4, a linhagem de melanoma murino (B16F10-Nex2.1), a linhagem de melanoma humano (A2058), linhagens de carcinoma de cólon humano (HCT-8 e LS180), linhagens de carcinoma de mama humano (MCF-7 e SKBR-3), a linhagem de tumor de cérvix uterino humano (SiHa) e a linhagem de leucemia mielóide aguda humana (HL-60) foram cultivados em meio completo, contendo RPMI-1640 pH 7,4 (Gibco) suplementado com 10 mM de HEPES (USB), 24 mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 40 mg/mL de gentamicina (Hipolabor) e 10% de soro fetal bovino (LGC), a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂.

As linhagens tumorais humanas de cérvix uterino (HeLa) e glioblastoma (U87-MG) foram cultivadas em meio DMEM pH 7,4 (Gibco) suplementado com 10 mM de HEPES (USB), 24 mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 40 mg/mL de gentamicina (Hipolabor) e 10% de soro fetal bovino (LGC), a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂.

Células da linhagem de melanócitos murinos imortalizados (melan A) foram cultivadas em meio RPMI-1640 pH 6,9 (Gibco) suplementado com 10 mM de HEPES (USB), 24 mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 40 mg/mL de gentamicina (Hipolabor), 5% de soro fetal bovino (LGC) e 2 µM do mitógeno PMA (Sigma). Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michel Rabinovich do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

As linhagens tumorais humanas foram obtidas do Banco de Células do Instituto Ludwig de Pesquisas contra o Câncer e do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3.3. Produção, purificação e reatividade do mAb A4

3.3.1. Produção e purificação do mAb A4 por cromatografia de afinidade

Camundongos Balb/c fêmeos (a partir de doze semanas) foram tratados intraperitonealmente com 1 mL de óleo mineral (Nujol[®], Mantecorp). Após quatro dias, foram injetados intraperitonealmente 2×10^6 células do hibridoma secretor do mAb A4. Cerca de dez dias após a injeção do hibridoma, o líquido ascítico foi retirado e centrifugado duas vezes a 3.000 rpm por 10 min a 4 °C. Foram descartadas as frações celular e adiposa. Para a purificação do mAb A4, o líquido ascítico foi filtrado duas vezes em filtro com porosidade de 0,22 μm (Millipore) e purificado por cromatografia de afinidade em coluna Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech). Previamente, a coluna de afinidade foi equilibrada com 50 mL de PBS 1X. O líquido ascítico foi diluído cinco vezes em PBS 1X e cerca de 50 mL foram aplicados na coluna. Em seguida, a coluna foi lavada com 50 mL de PBS 1X para retirar proteínas ligadas inespecificamente à resina. A eluição do mAb A4 foi realizada com 15 mL de 0,1 M de glicina pH 2,8 (Amersham Biosciences). Frações de 1 mL foram coletadas e neutralizadas com 50 μL de 1 M de Tris-HCl pH 9,0 (Merck). As frações que continham proteínas foram detectadas pelo micrométodo de Bradford (Bradford, 1976). A concentração das amostras foi realizada em Célula Amicon por pressão negativa de N_2

utilizando-se membrana com *cut-off* de 10.000 Da (Millipore). A diálise foi realizada com 10 volumes de PBS 1X no mesmo equipamento.

A quantificação do mAb A4 foi realizada a 280 nm em espectrofotômetro Hitach U-2000 e a pureza foi avaliada em eletroforese SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS) seguida por coloração com nitrato de prata. O gel de empacotamento era constituído por 3% de poliacrilamida (Pharmacia Biotech) em tampão contendo 125 mM de Tris-HCl pH 6,8 (Merck) e 0,1% de SDS (Sigma). O gel de separação era constituído por 10% de poliacrilamida em tampão contendo 375 mM de Tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS. Resumidamente, 15 μ L da amostra foram misturados com 5 μ L de tampão de amostra 4X [0,5 M de Tris-HCl pH 6,8 (Merck), 45% de glicerol (Sigma), 9% de SDS (Sigma), 1% de 2-mercaptoetanol (Merck) e 0,1 mg de azul de bromofenol (Merck)] e aquecidos a 100°C por cinco minutos. A eletroforese foi realizada a 100 V por aproximadamente 1h. Para a coloração com nitrato de prata, o gel foi fixado por 15 min com 50% de metanol (Synth), 12% de ácido acético (Merck) e 0,5% de formaldeído 37% (Merck). A seguir, foram realizadas duas lavagens de 10 min com 50% de etanol (Merck) e pré-tratamento com 0,2 g/L de tiosulfato de sódio (Merck) por 10 min. O tratamento com 2 g/L de nitrato de prata (Sigma) e 0,07% de formaldeído 37% (Merck) foi realizado por 10 min. Posteriormente, o gel foi revelado com 60 g/L de carbonato de sódio (Sigma), 0,5% de formaldeído 37% (Merck) e 4 mg/mL de tiosulfato de sódio (Merck). O bloqueio da reação foi feito com 50% de metanol e 12% de ácido acético.

3.3.2. ELISA Quimioluminescente (ELISA-Q)

A reatividade do mAb A4 purificado, do líquido ascítico ou do sobrenadante de cultura do hibridoma secretor do mAb A4 com a superfície das células tumorais murinas ou humanas foi verificada através do ensaio de ELISA-Q. Foram adicionadas 10^4 células por poço em placas brancas de ELISA-Q (Nunc), centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min e fixadas com 0,5% de glutaraldeído (Sigma) por 12h a 4 °C. Lavou-se a placa quatro vezes com PBS 1X contendo 0,05% de Tween. A neutralização foi realizada com 0,5 M de glicina (Amersham Biosciences) por 1h a temperatura ambiente. Lavou-se a placa novamente quatro vezes com PBS 1X contendo 0,05% de Tween. Os sítios de ligação livres foram bloqueados com solução contendo PBS 1X, 0,05% de Tween 20 (USB) e 1% de albumina bovina (Sigma) por 2h a temperatura ambiente. Foram realizadas mais quatro lavagens com PBS 1X contendo 0,05% de Tween. Em seguida, foi adicionado o mAb A4 diluído em tampão contendo PBS 1X, 0,05% de Tween 20 e 0,1% de albumina bovina por 12h a 4 °C. Após três lavagens com PBS 1X contendo 0,05% de Tween, prosseguiram-se as reações com anti-IgG murina biotilada (Sigma) e, em seguida, com estreptavidina-peroxidase (Sigma), ambas diluídas 1:1000 em tampão contendo 0,5 M de carbonato de sódio (Sigma) e 0,5 M de bicarbonato de sódio (Sigma) pH 9,6, por 1h a temperatura ambiente. Lavou-se a placa novamente por três vezes com PBS 1X contendo 0,05% de Tween. A revelação foi realizada com o reagente *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) diluído 1:100 em PBS 1X, a 470 nm, e a leitura realizada em luminômetro SpectraMaxL (Molecular Devices).

3.3.3. Immunoblotting

Adicionalmente, a reatividade do mAb A4 com proteínas presentes no lisado total das diferentes linhagens tumorais foi avaliada através de *Immunoblotting*.

Para obtenção do lisado total, 10^7 células foram lisadas com 15 volumes de tampão de lise contendo 0,9% de NaCl (Carlo Erba), 0,01 M de Tris-HCl pH 7,2 (Merck), 0,01 M de $MgCl_2$ (Sigma), 5 mM de PMSF (Merck) e 0,5 M de Nonidet P-40 (LKB), agitando-se o material em vortex por 15 min. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante resultante foi mantido por 12h a 4 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado novamente a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi então filtrado em filtro com poros de 0,45 μm (Millipore) e, a seguir, em filtro com poros de 0,22 μm (Millipore). A quantificação proteica foi realizada pelo micrométodo de Bradford (Bradford, 1976).

Trinta μg do lisado celular foram aplicados em gel SDS-PAGE (como descrito no item 3.3.1) e após a separação eletroforética, o gel foi equilibrado em tampão de transferência contendo 0,025 M de Tris-Base (Merck), 0,19 M de glicina (Amersham Biosciences) e 20% de Metanol (Synth) por 2 min. A transferência das proteínas do gel SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) foi realizada por 20 min a 20 V e 400 mA no equipamento *ECL Semi-Dry Transfer Unit* (Amersham Biosciences). A eficiência da transferência foi verificada através da coloração da membrana de nitrocelulose com solução contendo 0,1% de Ponceau S (USB) em 10% de ácido acético (Merck). Após lavagem da membrana de nitrocelulose com água destilada para retirada total do corante, a mesma foi bloqueada com solução de bloqueio contendo 0,05% de Tween 20 (USB) e 5% de leite desnatado (Molico[®], Nestlé) em PBS

1X por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi lavada três vezes com PBS 1X contendo 0,05% de Tween (PBS-T) por 10 min. Adicionou-se então o mAb A4 (30 µg/mL) diluído em PBS-T e 1% de leite desnatado por 12h a 4 °C. Lavou-se a membrana de nitrocelulose novamente três vezes com PBS-T por 10 min. Adicionou-se anti-IgG murina biotinizada (Sigma) diluída 1:500 em PBS-T e 1% de leite desnatado por 1h a temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens com PBS-T por 10 min. Adicionou-se estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluída 1:500 em PBS-T e 1% de leite Molico por 1h a temperatura ambiente. Lavou-se a membrana de nitrocelulose duas vezes com PBS-T por 10 min e uma vez com PBS 1X por 10 min. A revelação foi realizada em câmara escura com o reagente *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) diluído 1:1 em PBS 1X.

3.3.4. Imunofluorescência Indireta com células previamente fixadas

Lamínulas redondas de vidro (GlassTécnica) foram previamente tratadas com acetona (Synth) por 24h, lavadas em água destilada, lavadas em álcool 70%, flambadas, dispostas em placas de 24 poços (TPP, Switzerland) e expostas à luz ultravioleta por 30 min. Em seguida, 10^4 células no volume de 200 µL foram adicionadas sobre as lamínulas e a placa foi mantida em repouso para aderência das células durante 30 min. Adicionou-se mais 1 mL de meio completo e incubou-se a placa em estufa de CO₂ a 37 °C por 24h. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e as células foram fixadas com formaldeído 3,7% (Merck) por 15 min a temperatura ambiente. A seguir as lamínulas foram novamente lavadas por três vezes com PBS 1X e bloqueadas com tampão de bloqueio contendo 150 mM de NaCl (Carlo Erba), 50 mM de Tris-Base (Merck), 0,25% de albumina soro bovina (Sigma) e 0,05% de Tween 20 (USB) por 1h a

temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS 1X, foi adicionado o mAb A4 (50 µg/mL) diluído em tampão de bloqueio por 1h a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e adicionou-se anti-IgG murina biotilada (Sigma) diluída 1:500 em PBS 1X por 1h a temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens com PBS 1X e adicionou-se estreptavidina-FITC (Pharmlingen) diluída 1:250, Faloidina-TRITC (*Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate*, Invitrogen) diluída 1:250 e DAPI (Sigma) diluído 1:50 em tampão de bloqueio por 1h a temperatura ambiente. Por fim, foram realizadas três lavagens com PBS 1X e as lamínulas foram montadas invertidas em lâminas com 4 µL do protetor de fluorescência VectaShield (Vector).

Para verificar a expressão da molécula PCDHβ13 em linhagens tumorais humanas e murinas, após o bloqueio das lamínulas e lavagens com PBS 1X, adicionou-se anti-PCDHβ13 humana (Abcam) diluída 1:50 por 1h a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e adicionou-se anti-IgG murina conjugada a AlexaFluor 488 (Invitrogen) diluída 1:100, Faloidina-Rodamina (Invitrogen) diluída 1:2500 e DAPI (Sigma) diluído 1:100 em tampão de bloqueio por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem, as lamínulas foram montadas em lâminas como descrito acima.

A visualização das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus (Modelo BX-51), com câmera digital integrada (Modelo DF-71) no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia, UNIFESP.

3.3.5. Imunofluorescência Indireta com células fixadas após tratamento com o mAb A4 *in vitro*

Células em lamínulas redondas de vidro foram preparadas como descrito no item 3.3.4. Após adesão das mesmas, adicionou-se 1 mL de meio completo e incubou-se a placa em estufa de CO₂ a 37 °C por 24h. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e foi adicionado o mAb A4 (50 µg/mL ou 500 µg/mL) diluído em meio completo por 10 min ou 60 min a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS 1X, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% (Merck) por 1h a temperatura ambiente. A seguir as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS 1X e bloqueadas com tampão de bloqueio contendo 150 mM de NaCl (Carlo Erba), 50 mM de Tris-Base (Merck), 0,25% de albumina soro bovina (Sigma) e 0,05% de Tween 20 (USB) por 1h a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e adicionou-se anti-IgG murina conjugada a AlexaFluor 488 (Invitrogen) diluída 1:100, Faloidina-Rodamina (Invitrogen) diluída 1:500 e DAPI (Sigma) diluído 1:100 em tampão de bloqueio por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem, as lamínulas foram montadas em lâminas como descrito no item 3.3.4.

Para localização do mAb A4 após sua internalização em vesículas endocíticas, após o bloqueio das lamínulas e lavagens com PBS 1X, adicionou-se anti-LAMP-1 murina (cortesia do Prof. Dr. Renato Arruda Mortara) diluída 1:1 por 1h a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e adicionou-se anti-IgG murina conjugada a AlexaFluor 488 (Invitrogen) diluída 1:100, anti-Ig de rato-AlexaFluor 568 (Invitrogen) diluído 1:100 e DAPI (Sigma) diluído 1:100 em tampão de bloqueio por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem, as lamínulas foram montadas em lâminas como descrito acima. A visualização das lâminas foi realizada em

microscópio de fluorescência confocal Zeiss Axiovert 100 acoplado ao instrument BioRad 1024UV, usando lentes 63X 1.4 NA DIC (ou 100X 1.4 NA Phase contrast) com óleo de imersão. Séries-Z foram processadas com o Software ImageJ. A visualização das lâminas foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Renato Arruda Mortara (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP).

3.4. Expressão gênica da PCDH β 13 por RT-PCR

3.4.1. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir de 5×10^6 células com o reagente TRIZOL™ (Invitrogen) ou alternativamente, com o *NucleoSpin RNA/Protein Kit* (Macherey-Nagel) conforme instruções dos fabricantes.

Na extração com o reagente Trizol, as células foram incubadas com 1 mL de Trizol por 5 min a temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (Merck), mantendo-se as amostras no gelo por 3 min. Após centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C, adicionou-se ao sobrenadante 500 μ L de isopropanol (Merck) e 100 μ L de solução contendo 1,2 M de citrato de sódio (Merck) e 0,8 M de NaCl (Carlo Erba), incubando-se a -20 °C por 12h. Em seguida, centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Merck). Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 min a 4 °C, o precipitado foi seco a temperatura ambiente por cerca de 30 min e ressuspendido em água ultrapura (Milli-Q, Millipore) autoclavada.

A quantificação do RNA e a determinação de sua pureza foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi U-2000 utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Concentração de RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{Absorbância a 260 nm} \times \text{Diluição} \times 40 \times 10^{-3}$$

$$\text{Pureza do RNA} = \frac{\text{Absorbância a 260 nm}}{\text{Absorbância a 280 nm}}$$

Somente foram utilizadas amostras com pureza maior ou igual a 1,1.

Três μg de RNA foram misturados com 2 μL de tampão de amostra 6X [0,25% de Azul de Bromofenol (Sigma), 0,25% de Xilenocianol (Sigma), 15% de Ficoll 400 (USB) e 7 M de uréia (Bio-Rad)], aquecidos a 65 °C por 10 min e resfriados em gelo por 1 min. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% a 100 V por aproximadamente 45 min. A qualidade do RNA foi considerada como satisfatória nas amostras em que foi possível visualizar as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S.

3.4.2. Síntese de cDNA

O RNA extraído foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando *Ready-to-go T-primed first-strand Kit* (Amersham Biosciences). Resumidamente, 2 μg de RNA total foram aquecidos a 65 °C por 5 min, seguidos por incubação a 37 °C por mais 5 min. O RNA foi então adicionado ao tubo contendo os reagentes previamente associados e incubado a 37 °C por 5 min. A reação foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 1h para a síntese do cDNA.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Hitachi U-2000 a 260 nm utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{Absorbância a 260 nm} \times \text{Diluição} \times 50 \times 10^{-3}$$

3.4.3. RT-PCR, purificação dos produtos de PCR e seqüenciamento

As PCRs foram feitas utilizando-se *primers* para a seqüência do gene codificador da PCDH β 13 murina e humana. Como controle constitutivo do ensaio foram utilizados *primers* para os genes da β -actina murina e humana. As seqüências dos *primers* utilizados para as diferentes reações e suas temperaturas de anelamento estão mostradas na Tabela 2. As seqüências dos *primers* para amplificação do gene da PCDH β 13 murina (RT13M3 e RT13M4) foi selecionada por Junghans (2008).

As condições das reações para a amplificação dos produtos de RT-PCR estão disponibilizadas na Tabela 3 (PCDH β 13 murina e humana), Tabela 4 (β -actina murina e humana) e Tabela 5 (ciclos da reação). Para confirmação da amplificação, 10 μ L de cada produto foi verificado em gel de agarose 1%, como descrito no item no item 3.4.2.

Tabela 2. *Primers* utilizados para a amplificação dos genes da PCDH β 13 e da β -actina. (M) Murina e (H) Humana. *T* ($^{\circ}$ C), Temperatura de anelamento utilizada; *Produto* (pb), tamanho esperado do fragmento amplificado em pares de bases.

Gene	Primer	Seqüência (5'- 3')	T ($^{\circ}$ C)	Produto (pb)
PCDH β 13 (M)	Direto	TTTATGATAGCGCCTGGGAATGG	55	237
	Reverso	AGAGAAGGGGGATGGAGTGAAGAACT	55	
PCDH β 13 (H)	Direto	GAGGCAAGAGATGCTGGAAC	55	364
	Reverso	CGATCAGCACGGTCATATTG	55	
β -actina (M)	Direto	CAGAGCAAGAGAGGGATCCTGA	55	876
	Reverso	TGATCCACATCTGCTGGAAGGT	55	
β -actina (H)	Direto	GGTGTTTGCTTTGACACCCT	58	884
	Reverso	GCTTCTGCCCACTTCCTTC	58	

Tabela 3. Condições para amplificação do gene da PCDH β 13 murina e humana. *Tampão 5X pH 9,0*: 300 mM de Tris-HCl e 75 mM de sulfato de amônio, pH 9,0. dNTP, *Deoxyribonucleotide triphosphate mixture*.

Reagentes (Invitrogen)	Volume (μ L)	Concentração Final
Água Milli-Q	30,2	-
Tampão 5X pH 9,0	10,0	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTP (10 mM)	2,0	400 μ M
<i>Primer Direto</i> (10 μ M)	2,0	400 nM
<i>Primer Reverso</i> (10 μ M)	2,0	400 nM
cDNA	2,0	-
<i>Taq DNA Polymerase</i> (5U/ μ L)	0,3	1,5 U

Tabela 4. Condições para amplificação do gene da β -actina murina e humana.

Reagentes (Invitrogen)	Volume (μ L)	Concentração Final
Água Milli-Q	35,2	-
Tampão 10X	5,0	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTP (10 mM)	2,0	400 μ M
<i>Primer Direto</i> (10 μ M)	2,0	400 nM
<i>Primer Reverso</i> (10 μ M)	2,0	400 nM
cDNA	2,0	-
<i>Taq DNA Polymerase</i> (5U/ μ L)	0,3	1,5 U

Tabela 5. Condições dos ciclos para amplificação utilizados.

Etapa	Condição	Tempo
1) Desnaturação do DNA	94°C	5 min
2) Desnaturação do DNA	94°C	1 min
3) Anelamento dos <i>primers</i>	Temperatura média dos <i>primers</i>	45s
4) Extensão da nova fita de DNA	72°C	4 min
5) Amplificação	Repetir Etapas 2 a 4 por 35 vezes	-
6) Extensão final	72°C	10 min
7) Término	4°C	∞

A confirmação da identidade do produto de PCR da PCDH β 13 humana foi realizada através de seqüenciamento do amplicon no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, utilizando-se a linhagem de tumor de cólon humano HCT-8. Para isso, a reação foi feita em maior volume (400 μ L). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% e a banda correspondente ao fragmento de tamanho esperado foi cortada e purificada com o *NucleoSpin Extract II PCR Clean-up and Gel Extraction Kit* (Macherey-Nagel), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado visualmente em gel de agarose 2% e a amostra foi enviada para seqüenciamento.

A análise da qualidade do cromatograma foi realizada com o Software BioEdit. A identidade da seqüência de DNA foi verificada com o programa BLAST disponível no servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.5. Citotoxicidade e mecanismo de morte celular desencadeado pelo mAb A4 em células tumorais *in vitro*

3.5.1. Avaliação da viabilidade celular

Células tumorais murinas e humanas foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) por 24h. A quantificação da viabilidade celular foi realizada cerca de 20h após a adição de diferentes concentrações do mAb A4 e realizada pelo ensaio MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] ou por contagem de células viáveis na presença do corante de exclusão Trypan Blue (Gibco).

No ensaio com MTT, que quantifica espectrofotometricamente células metabolicamente ativas, após a incubação com mAb A4 foram adicionados 10 μ L de

MTT (5 mg/mL diluídos em PBS 1X). Depois de 4h, foram adicionados 100 µL de tampão de solubilização contendo 0,01 M de HCl (Merck) e 10% de SDS (Sigma) seguindo-se incubação por 24h para a solubilização dos cristais formados pelo MTT. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 570 nm.

Na quantificação por contagem com o corante de exclusão Trypan Blue, o meio de cultura contendo o mAb A4 foi aspirado e foram adicionados 25 µL de 10% de tripsina (Gibco). Incubou-se a placa por 5 min a 37 °C para desaderência das células. A ação da tripsina foi bloqueada com a adição de 25 µL de meio completo. Para contagem em câmara de Neubauer, 10 µL da amostra foram misturados a 10 µL do corante Trypan Blue e 10 µL foram então aplicados na câmara para contagem.

3.5.2. Análise da exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática

O tipo de morte celular desencadeada pelo mAb A4 nas células B16F10-Nex2.1 também foi analisado com o *Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 1×10^6 células foram adicionadas em placas de 6 poços (TPP), incubadas por 18h, e foram adicionados 400 µg/mL de mAb A4, seguindo-se nova incubação por 12h. As células foram lavadas uma vez com PBS 1X, desaderidas com PBS 1X - 0,02% de EDTA e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min. Ao *pellet* celular, adicionou-se 1 mL de *Binding Buffer*, fornecido pelo kit. A cada 500 µL de células foram adicionados 10 µL de iodeto de propídeo e 5 µL de Anexina V-FITC, incubando-se por 10 min a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, CA, USA) e com o Software CellQuest[®] (BD Biosciences).

Como controle negativo, utilizaram-se células não tratadas com mAb A4. Para compensação dos valores de anexina V-FITC e iodeto de propídeo, utilizaram-se células incubadas com o mAb A4 marcadas somente com anexina V-FITC ou com iodeto de propídeo.

3.5.3. Ensaio para verificação da ativação de caspases

Células tumorais murinas e humanas foram cultivadas em garrafas de 75 cm² até atingirem cerca de 90% de confluência. Foram adicionados 400 µg/mL do mAb A4 por 18h a 37 °C. Utilizando-se o *ApoTarget Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit* (Invitrogen) verificou-se a ativação das caspases-2, -3, -6, -8 e -9, segundo instruções do fabricante. Resumidamente, 50 µL de *Cell Lysis Buffer* (fornecido pelo kit) foram adicionados a 5 x 10⁶ células por 10 min. Após centrifugação a 12.000 rpm por 1 min, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi obtida pelo micrométodo de Bradford (Bradford, 1976). A reação foi realizada em placas de 96 poços com 200 µg de proteína, 50 µL de *Reaction Buffer* e 200 µM de substrato, ambos fornecidos pelo kit, por 2h a 37°C. As amostras foram lidas em espectrofotômetro para leitura de placas Tecan, Modelo Sunrise (Tecan Group, USA) a 405 nm.

3.5.4. Ensaio para verificação da produção de espécies reativas de oxigênio

A análise da produção de ânions superóxido foi realizada conforme descrito por Mezhybovska *et.al.* (2009) com algumas modificações. Resumidamente, 10⁴ células tumorais foram cultivadas em lamínulas redondas de vidro como descrito no item 3.3.4. Após 1, 3, 6 ou 18h de incubação com 400 µg/mL de mAb A4, células foram

submetidas ao ensaio com *dihydroethidium* (DHE, Invitrogen). Como controle positivo da geração de ânions superóxido, foram utilizados 5 mM de H₂O₂ por 20 min.

3.5.5. Ensaio para verificação de condensação da cromatina

Células em lamínulas redondas de vidro foram preparadas como descrito no item 3.3.4, utilizando-se 2x10⁴ células/lamínula. Após adesão das mesmas, adicionou-se 1 mL de meio completo e incubou-se a placa em estufa de CO₂ a 37 °C por 24h. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e foram adicionados 400 µg/mL do mAb A4 diluído em meio completo por cerca de 20h a 37 °C. As lamínulas foram lavadas com PBS 1X e incubadas com 2 µM do corante Hoechst 33258 (Invitrogen) por 10 min e montadas invertidas em lâminas com 4 µL do protetor de fluorescência VectaShield (Vector).

A visualização das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus (Modelo BX-51), com câmera digital integrada (Modelo DF-71), no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia, UNIFESP.

3.5.6. Ensaio para verificação de degradação do DNA: formação do *DNA ladder* em gel de agarose

Células tumorais murinas e humanas foram cultivadas em placas de 24 poços (1x10⁵ células/poço) por 24h. Em seguida, foram adicionados 400 µg/mL do mAb A4 seguindo-se incubação por 24h a 37 °C. Como controle positivo de fragmentação de

DNA induzida por apoptose foi utilizado 1 µg/mL de actinomicina-D (Sigma) por 24h a 37 °C.

Para a extração do DNA, as células foram lisadas com 500 µL de tampão TELT contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 (Merck), 2,5 mM de EDTA pH 9,0 (USB), 4% de Triton X-100 (Sigma) e 2,5 mM LiCl (Sigma) e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. Ao sobrenadante, adicionou-se um volume de fenol equilibrado pH 8,0 (USB) e centrifugou-se 12.000 rpm por 30 min a 4 °C. À fase aquosa do sobrenadante adicionou-se clorofórmio (1:1, v:v, Merck) e centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. Ao sobrenadante contendo os ácidos nucléicos foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3,0 M pH 5,5 (Sigma) e 2,5 volumes de etanol absoluto (Merck), seguindo-se incubação a -20°C por 12h. Após centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C, o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por cerca de 30 min e posteriormente ressuspendido em água ultrapura (MilliQ, Millipore) autoclavada contendo 50 µg/mL de RNase A (USB).

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Hitachi U-2000 a 260 nm utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{Absorbância a } 260 \text{ nm} \times \text{Diluição} \times 50 \times 10^{-3}$$

Cerca de 2 µg de DNA foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 1%. As amostras foram homogeneizadas com 2 µL de tampão de amostra 6X [0,25% de azul de bromofenol (Sigma), 0,25% de xilenocianol (Sigma) e 15% de Ficoll 400 (Pharmacia Biotech)] e submetidas à corrida eletroforética em tampão contendo 89 mM de Tris-HCl (Merck), 89 mM de ácido bórico (Sigma) e 20 mM de EDTA (USB) a 100 V por 1h.

3.5.7. Ensaio para verificação de degradação do DNA: TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling*)

Células em lamínulas redondas de vidro foram preparadas como descrito no item 3.3.4, utilizando-se 2×10^4 células/lamínula. Após adesão das mesmas, adicionou-se 1 mL de meio completo e incubou-se a placa em estufa de CO₂ a 37 °C por 24h. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e foram adicionados 400 µg/mL mAb A4 diluído em meio completo por cerca de 20h a 37 °C. As células foram fixadas com 4% de formaldeído (Merck) por 30 min a temperatura ambiente. A seguir as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS 1X e incubadas com solução de permeabilização contendo 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio por 30 min a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e procedeu-se a reação de TUNEL utilizando-se o *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche), segundo instruções do fabricante. Foram adicionados 50 µL de TUNEL Reaction Mixture por 1h a 37 °C. Após três lavagens com PBS 1X, adicionou-se DAPI (Sigma) diluído 1:100 em PBS 1X por 10 min a temperatura ambiente. Por fim, foram realizadas três lavagens com PBS 1X e as lamínulas foram montadas invertidas em lâminas com 4 µL do protetor de fluorescência VectaShield (Vector).

A visualização das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência confocal Zeiss Axiovert 100 acoplado ao instrument BioRad 1024UV, usando lentes 63X 1.4 NA DIC ou 100X 1.4 NA Phase contrast) com óleo de imersão. Séries-Z foram processadas com o Software ImageJ. no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Disciplina de Parasitologia, UNIFESP.

3.5.8. Microscopia eletrônica de transmissão

Células tumorais (5×10^4) foram cultivadas em discos plásticos de Agar por 24h e posteriormente incubadas com 400 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4 por 18h. Após incubação, as células foram fixadas com uma mistura de 2,5% de glutaraldeído e 2% formaldeído em 0,1% de tampão cacodilato de sódio pH 7.2 por 20h. Após lavagem com tampão cacodilato por 10 min, as células foram tratadas com 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato por 30 min e, posteriormente, com uma solução aquosa de 0,4% de acetato de uranila por 30 min. Entre esses procedimentos, as células foram lavadas com água por 10 min. Em seguida, as células foram desidratadas em series alcoólicas de etanol (70%, 90% e 100%), tratadas com óxido de propileno e embebidas em resina EPON. Após 24h, regiões específicas foram selecionadas para trimagem dos blocos. Seções semi-finas das regiões selecionadas foram coletadas e coradas em solução alcoólica de 1% de acetato de uranila para análise em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII.

3.6. Determinação da via de sinalização intracelular induzida pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1

3.6.1. Immunoblotting

Células tumorais de melanoma murino B16F10-Nex2.1 foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2 até atingirem cerca de 80% de confluência. O meio de cultivo foi então substituído por meio RPMI sem soro fetal bovino, e as células cultivadas por

cerca de 18h. As células foram então tratadas com 500 µg/mL de mAb A4 diluído em meio sem soro por 10, 30 ou 60 min a temperatura ambiente com agitação suave.

Para obtenção do extrato celular total, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X, desaderidas com 0,25% Tripsina (Sigma) e neutralizadas com cinco volumes de meio sem soro. As células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min a 4 °C e lavadas por três vezes com PBS 1X. Adicionou-se 80 µL de tampão de lise por 15 min no gelo. O tampão de lise era constituído por 50 mM de Tris-HCl pH 7,4; 100 mM de NaCl; 0,5% de Nonidet P-40; 50 mM de NaF (inibidor de serina e treonina fosfatases); 1 mM de NaVO₄ (inibidor de tirosina fosfastases); 0,5 mM de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*, inibidor de serina e cisteína proteases); 1 mM de AEBSF (*4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*, inibidor de serina proteases); 800 nM de aprotinina (inibidor de tripsina, quimiotripsina e plasmina); 50 µM de bestatina (inibidor de aminopeptidases); 15 µM de E64 (*L-transepoxy succinyl-leucylamido-[4-guanidino]butane*, inibidor de cisteína proteases); 20 µM de leupeptina (inibidor de enzimas lisossomais); e 10 µM de pepstatina A (inibidor de aspartato proteases). O lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min e a concentração de proteínas no sobrenadante foi avaliada pelo micrométodo de Bradford (Bradford, 1976).

Quarenta µg de amostra foram aplicadas em gel SDS-PAGE, e a transferência para membrana de nitrocelulose, lavagens, bloqueio, incubação com anticorpos primário e secundário, e revelação foram realizados como descrito no item 3.3.3. Os anticorpos primários anti-β-actina (*β-actin (13E5) rabbit mAb*), anti-β-catenina total (*β-catenin (L87A12) mouse mAb*), anti-β-catenina fosforilada (*Phospho β-catenin (Ser35/37/Thr41) Antibody*) e anti-TCF-4 (*TCF/LEF1 Antibody Sampler Kit*) foram adquiridos da Cell Signaling. Os anticorpos secundários anti-mouse IgG-peroxidase e anti-rabbit IgG-peroxidase foram adquiridos da Sigma.

3.6.2. Localização celular da β -catenina

Células em lamínulas redondas de vidro foram preparadas como descrito no item 3.3.4, utilizando-se 2×10^4 células/lamínula. Após adesão das mesmas, adicionou-se 1 mL de meio completo e incubou-se a placa em estufa de CO_2 a 37 °C por 24h. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e foram adicionados 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mAb A4 diluído em meio completo por 30 ou 60 min a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS 1X, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% (Merck) por 1h a temperatura ambiente. A seguir as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS 1X e bloqueadas com tampão de bloqueio contendo 150 mM de NaCl (Carlo Erba), 50 mM de Tris-Base (Merck), 0,25% de albumina soro bovina (Sigma) e 0,05% de Tween 20 (USB) por 1h a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e adicionou-se anti- β -catenina total (β -catenin (L87A12) mouse mAb, Cell Signaling) diluída 1:100 em tampão de bloqueio por 1h a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS 1X, adicionou-se anti-IgG murina conjugada a AlexaFluor 488 (Invitrogen) diluída 1:100 e DAPI (Sigma) diluído 1:100 em tampão de bloqueio por 1h a temperatura ambiente. Por fim, foram realizadas três lavagens com PBS 1X e as lamínulas foram montadas invertidas em lâminas com 4 μL do protetor de fluorescência VectaShield (Vector).

4. RESULTADOS

Dobroff e colaboradores (2002) obtiveram anticorpos monoclonais (mAb) contra antígenos do melanoma murino B16F10 após imunização de camundongos C57BL/6 singênicos com células do melanoma murino B16F10-Nex4, cultivadas em soro de camundongo normal, e o adjuvante hidróxido de alumínio. Foram obtidos dois mAbs, um da classe IgM denominado A4M, e outro da classe IgG denominado A4. Demonstrou-se que o mAb A4 é citotóxico *in vitro* para células do melanoma murino B16F10-Nex2, de maneira independente do complemento, embora a presença deste aumente o efeito observado. O efeito protetor do mAb A4 foi também verificado *in vivo*, com a redução do desenvolvimento tumoral subcutâneo e pulmonar, aumentando significativamente a sobrevivência dos animais. A interação do mAb A4 com células de melanoma murino *in vitro* levou à algumas alterações sugestivas de apoptose, tais como degradação do DNA em fragmentos com 200 pares de bases e exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática. O mAb A4 reconhece especificamente uma proteína de superfície celular de 87 kDa no melanoma murino B16F10-Nex2, identificada como Protocaderina β 13 (PCDH β 13) (Dobroff *et. al.*, 2002 e Dobroff *et. al.*, 2010, em publicação).

Dando continuidade a esses resultados, inicialmente, avaliamos a ligação do mAb A4 à superfície de células tumorais murinas e humanas e a susceptibilidade dessas células à ação citotóxica promovida pelo mesmo. Esses dados foram correlacionados com a expressão do mRNA e da proteína PCDH β 13 nessas células tumorais.

Posteriormente, caracterizamos o mecanismo de morte celular desencadeada pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 em linhagens tumorais de melanomas

murino (B16F10-Nex2.1) e humano (A2058), assim como determinamos a participação da via de sinalização intracelular Wnt/ β -catenina nesse processo.

4.1. Produção e purificação do mAb A4

Para verificar se o hibridoma secretor do mAb A4 ainda mantinha suas características originais, células foram cultivadas *in vitro*, o sobrenadante de cultura foi recolhido e sua reatividade com o melanoma murino B16F10-Nex2.1 foi testada em ELISA-Q. Confirmou-se que havia secreção de anticorpos do isótipo esperado (IgG) para o sobrenadante de cultura e que a reatividade com o melanoma murino B16F10-Nex2.1 era dose-dependente (dados não mostrados).

Para a produção do mAb A4 em maiores quantidades, camundongos Balb/c fêmeas com cerca de 12 semanas foram injetados intraperitonealmente com 1 mL de óleo mineral (Nujol, Mantecorp, Brasil) e após quatro dias, foram injetadas 2×10^6 células do hibridoma secretor no mesmo sítio. Cerca de dez dias após a injeção do hibridoma, o líquido ascítico foi coletado e os anticorpos foram purificados em coluna Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech), como descrito em Materiais e Métodos.

O material purificado foi analisado através de eletroforese, quantificado e sua reatividade foi verificada (Figura 5). Na Figura 5A, verificou-se que a purificação do mAb A4 foi bem sucedida devido à presença majoritária das bandas correspondentes às cadeias pesadas (55 kDa) e cadeias leves (25 kDa) do anticorpo.

A reatividade do mAb A4 purificado foi avaliada através de ELISA-Q com a linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1, e verificou-se que o mAb A4 reconheceu as células B16F10-Nex2.1 de maneira dose-dependente (Figura 5B).

Verificou-se também que o mAb A4 purificado reconheceu especificamente por *Immunoblotting* a banda de 87 kDa, correspondente à PCDH β 13, no lisado de células B16F10-Nex2.1 (Figura 5C).

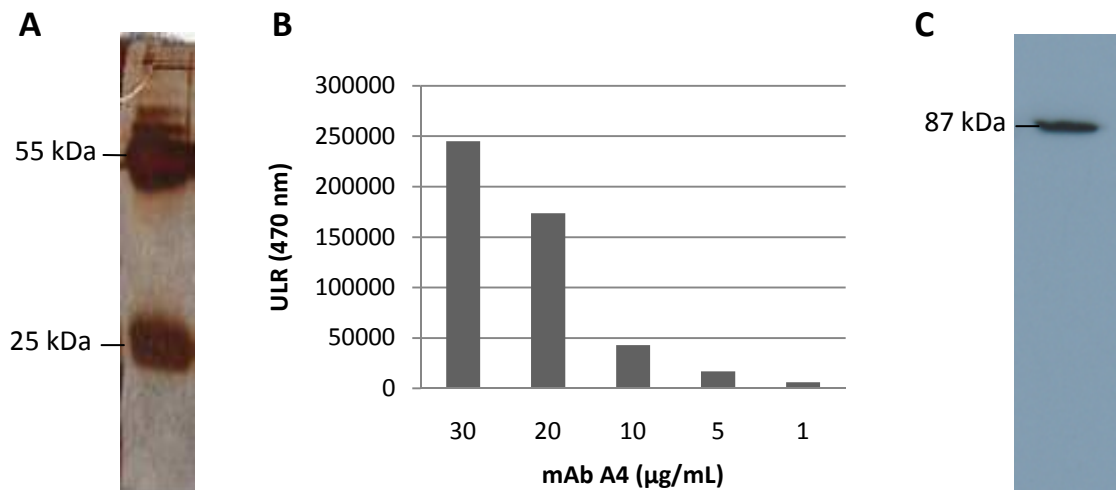
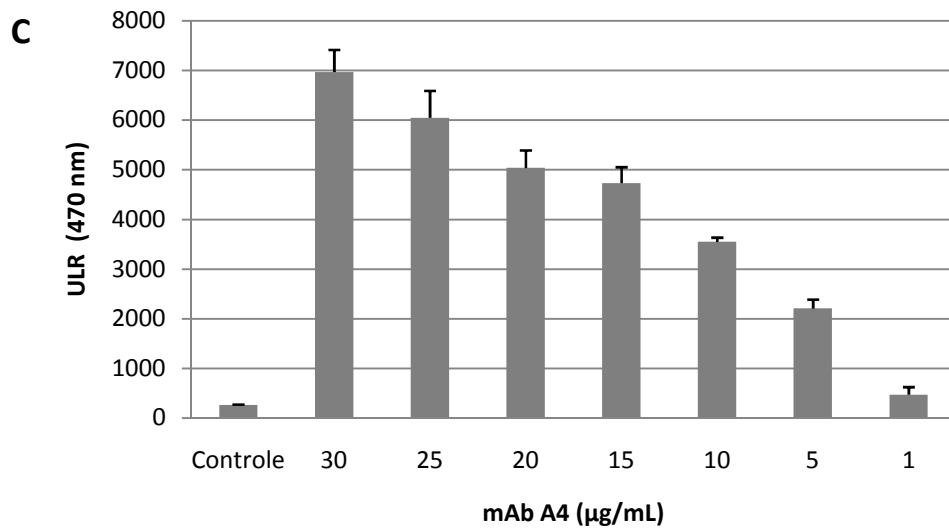
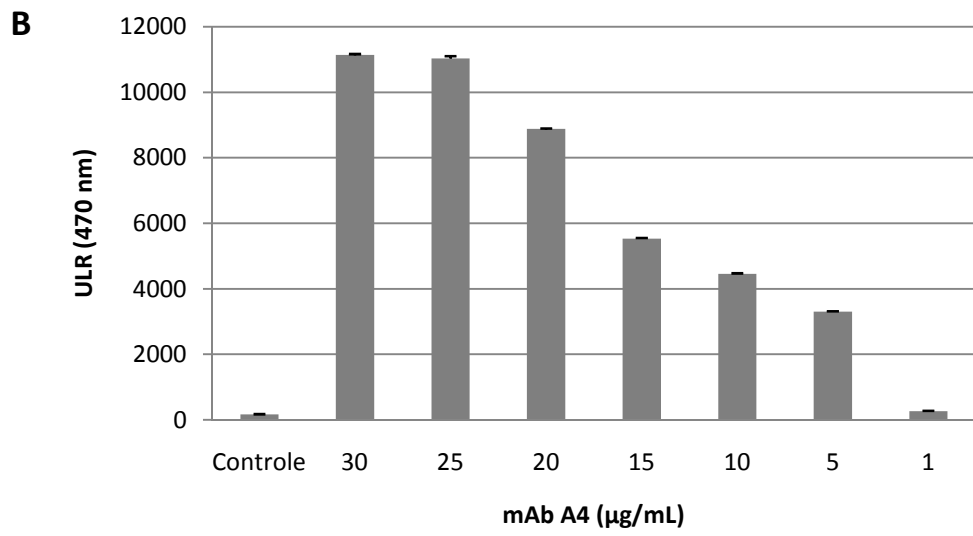
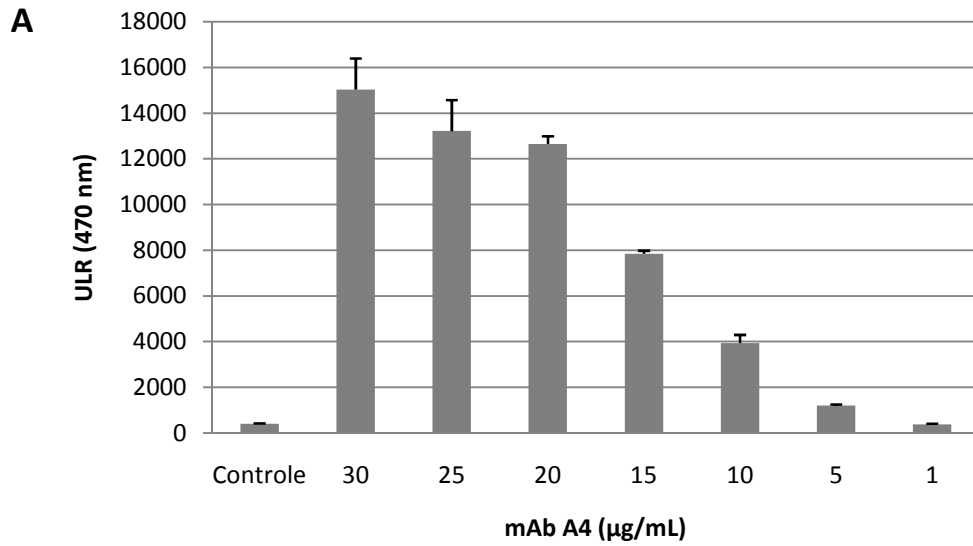


Figura 5. Purificação e reatividade do mAb A4 com células do melanoma murino B16F10-Nex2.1. **A)** O mAb purificado a partir de ascites, como descrito em Materiais e Métodos, foi separado eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE e corado com nitrato de prata. A Figura mostra a separação de 20 µg do mAb purificado. **B)** Diferentes concentrações do mAb A4 (30, 20, 10, 5 e 1 µg/mL) foram utilizadas para analisar a reatividade do mesmo com a linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 em ensaio de ELISA-Q, como descrito em Materiais e Métodos. O valor do Controle, reação na ausência de mAb A4, ficou abaixo de 1.000 ULR, e não está representado. *ULR*: Unidades de Luminescência Relativa. **C)** O lisado total de células B16F10-Nex2.1 cultivadas *in vitro* foi separado eletroforéticamente, transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com 30 µg/mL do mAb A4. O *Immunoblotting* foi revelado como descrito em Materiais e Métodos.

4.2. Reatividade do mAb A4 com linhagens tumorais murinas e humanas

4.2.1. ELISA Quimioluminescente (ELISA-Q)

Foi analisada a ligação do mAb A4 em ensaio de ELISA-Q com células tumorais do melanoma murino (B16F10-Nex2.1), melanoma humano (A2058), carcinoma de cólon humano (HCT-8), glioblastoma humano (U87-MG) e melanócitos murinos imortalizados (melan A). O mAb A4 ligou-se a todas as linhagens tumorais de forma dose-dependente (Figura 6). As linhagens de glioblastoma humano U87-MG e a linhagem de melanócitos murinos imortalizados (melan A) apresentaram as menores reatividades, sendo nesta última, reativas somente as maiores concentrações do anticorpo (Figuras 6D e 6E).



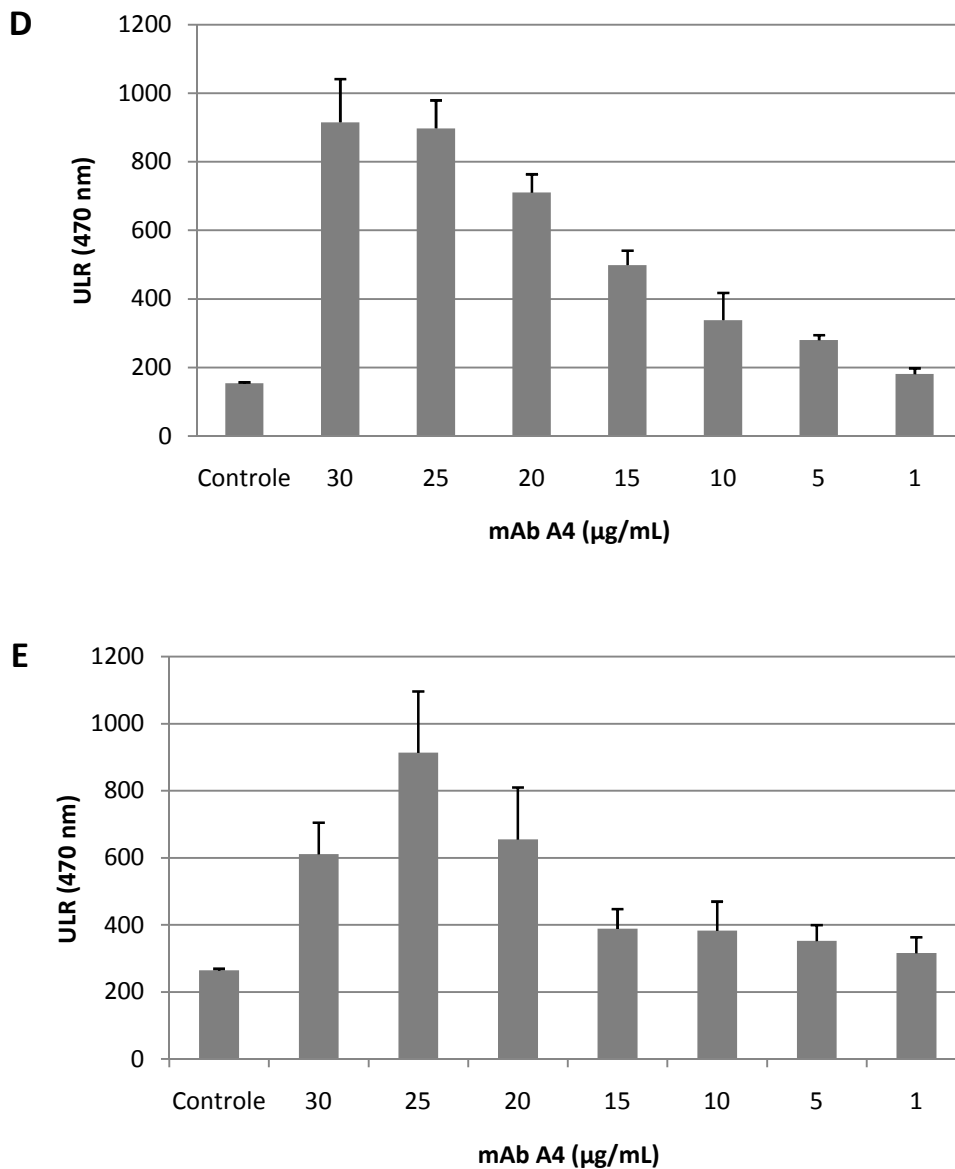


Figura 6. Reatividade do mAb A4 com linhagens tumorais murinas e humanas em ensaio de ELISA-Q. A reatividade de diferentes concentrações do mAb A4 (30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL) com diferentes linhagens tumorais foi analisada em ensaio de ELISA-Q, como descrito em Materiais e Métodos. **(A)** melanoma murino B16F10-Nex2.1; **(B)** melanoma humano A2058; **(C)** carcinoma de cólon humano HCT-8; **(D)** glioblastoma humano U87-MG; **(E)** melanócitos murinos imortalizados melan A. *Controle*: ensaio de ELISA-Q na ausência do mAb A4. *ULR*: Unidades de Luminescência Relativa.

4.2.2. Immunoblotting

A reatividade do mAb A4 purificado com lisados obtidos a partir de células tumorais murinas e humanas foi analisada por *Immunoblotting*. Foram utilizados lisados obtidos da linhagem de melanoma murino (B16F10-Nex2.1), da linhagem de melanoma humano (A2058), linhagens de carcinomas de cólon humano (HCT-8 e LS180), linhagens de carcinomas de cérvix uterino humano (HeLa e SiHa), linhagem de câncer de mama humana (MCF-7) e da linhagem de melanócitos murinos imortalizados (melan A). O mAb A4 reconheceu especificamente bandas de 87 kDa nos lisados das células tumorais A2058, HCT-8, LS180, HeLa e SiHa, sugerindo a presença do mesmo alvo, a PCDH β 13, nessas linhagens. Não houve reconhecimento pelo mAb A4 de nenhum componente no lisado das células MCF-7 e melan A (Figura 7).

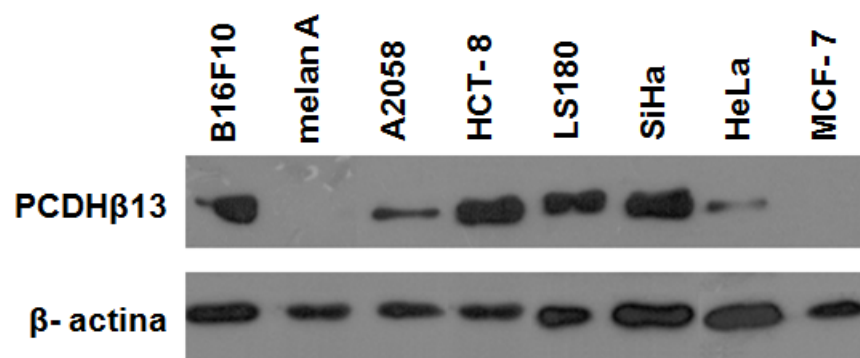


Figura 7. Reatividade do mAb A4 com linhagens tumorais murinas e humanas em *Immunoblotting*. 30 μ g do extrato celular total obtido de cada linhagem foram separados eletroforéticamente, transferidos para membrana de nitrocelulose, incubados com 30 μ g/mL de mAb A4, e a reação foi revelada como descrito em Materiais e Métodos. *Linhagens utilizadas:* melanoma murino: B16F10-Nex2.1; melanócitos murinos imortalizados: melan A; melanoma humano: A2058; carcinoma de cólon humano: HCT-8 e LS180; carcinoma de cérvix uterino humano: HeLa e SiHa; carcinoma de mama humano: MCF-7. Um anticorpo dirigido contra β -actina foi utilizado como controle.

4.2.3. Imunofluorescência Indireta

A reatividade do mAb A4 e de um anticorpo anti-PCDH β 13 humana (adquirido da empresa Abcam, MA, USA) com células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e células do melanoma humano A2058 foi verificada em ensaio de Imunofluorescência Indireta (Figura 8).

Observou-se que o mAb A4 reconhece componentes presentes na membrana plasmática de ambas as linhagens celulares, confirmando a presença do alvo do mAb na superfície celular, como sugerido anteriormente por Dobroff *et. al.* (2002).

O anticorpo comercial anti-PCDH β 13 humana comercializado pela Abcam é um anticorpo policlonal desenvolvido em camundongos e reativo com a molécula humana, e não sabíamos se o mesmo seria capaz de reconhecer o homólogo murino, pois esta informação não era conhecida pela empresa. Esse anticorpo apresentou um padrão de reatividade mais difuso em ambas as linhagens celulares, sendo esse efeito mais pronunciado nas células murinas. Esse efeito pode ser explicado pela reatividade cruzada do anticorpo policlonal com outros componentes das células murinas e humanas, como observado em ensaio de *Immunoblotting* realizado com os lisados celulares, onde vários componentes foram reativos com o anticorpo (dados não mostrados).

Esse anticorpo, o único disponível comercialmente contra a molécula PCDH β 13, foi adquirido para utilização em ensaios de competição com o mAb A4, caso fosse também reativo com o homólogo murino. Todavia, devido à sua reatividade cruzada com outros componentes celulares, tanto das células murinas como humanas, não pudemos utilizá-lo como previamente planejado.

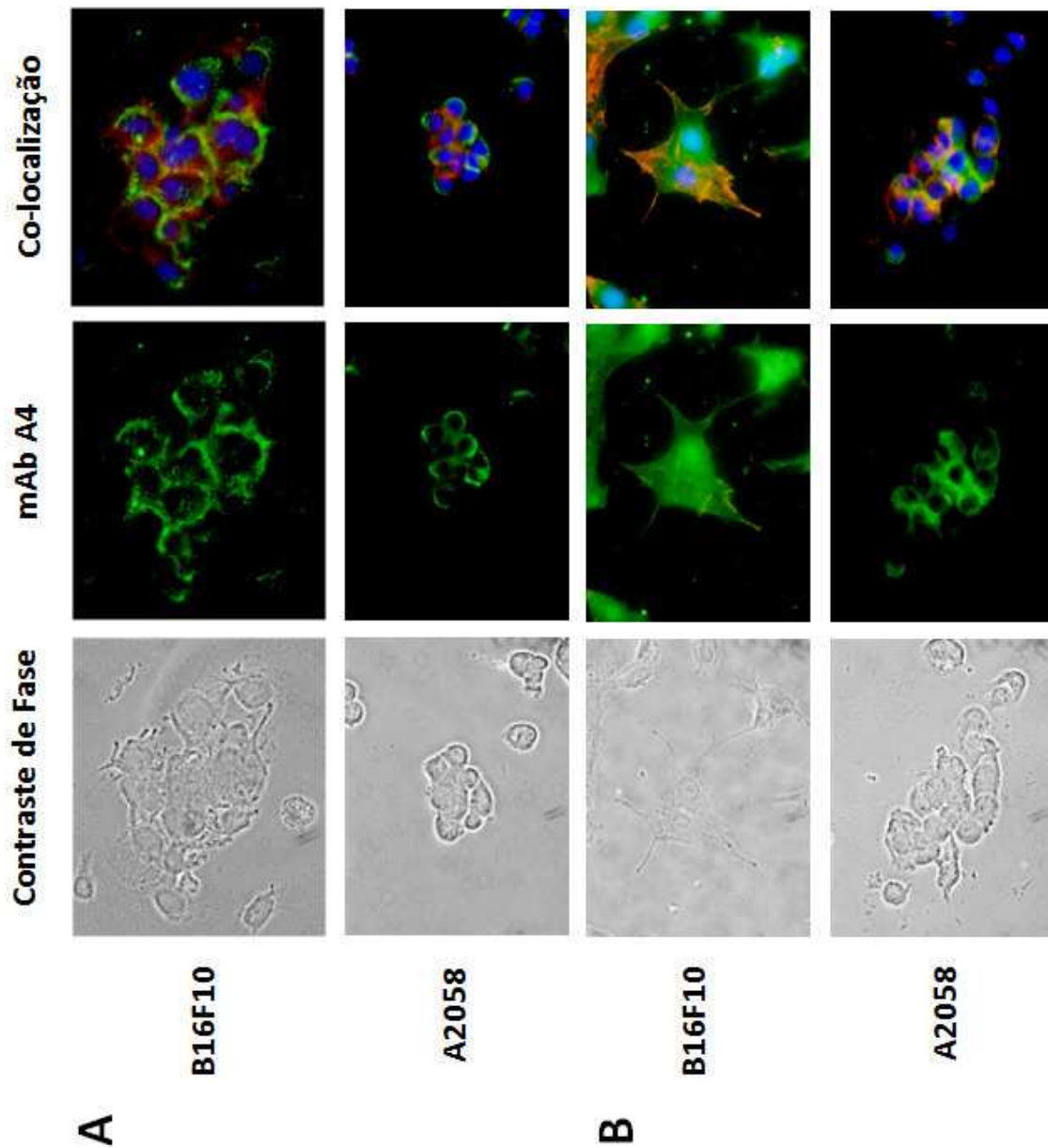


Figura 8. mAb A4 e o anticorpo policlonal de camundongo reativo com a PCDH β 13 humana reconhecem células murinas e humanas em Imunofluorescência Indireta. Células da linhagem de melanoma humano A2058 e de melanoma murino B16F10-Nex2 foram incubadas com mAb A4 (A) ou anti-PCDH β 13 humana (B), e em seguida com anti-IgG murina conjugada à AlexaFluor 488, DAPI e Faloidina-Rodamina, como descrito em Materiais e Métodos. *Co-localização*: sobreposição das imagens de DAPI, Faloidina-Rodamina e AlexaFluor 488. Aumentos de 600x.

4.3. Detecção da expressão da PCDH β 13 em linhagens tumorais murinas e humanas

4.3.1. Análise da expressão do gene PCDH β 13

O RNA total das células tumorais murinas e humanas foi extraído e separado eletroforéticamente em gel de agarose 1% (Figura 9). Todas as amostras foram consideradas satisfatórias devido à presença das duas bandas de RNA ribossomal 18S e 28S.

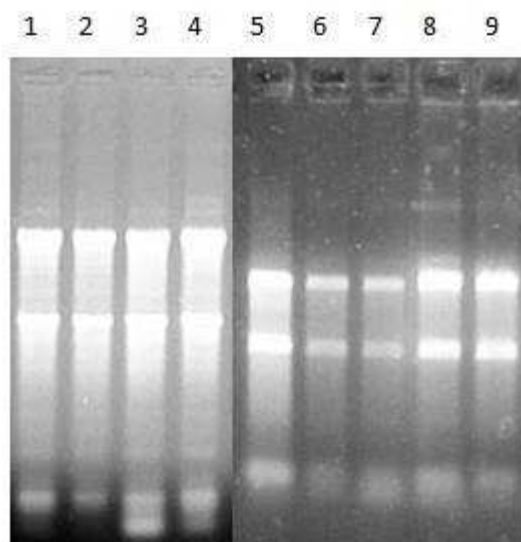


Figura 9. Análise da qualidade do RNA total extraído a partir de células tumorais murinas e humanas. 3 μ g de RNA total de cada linhagem foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 1%. Linhagens utilizadas: (1) melanoma murino B16F10-Nex2.1; (2) melanoma humano A2058; carcinoma de cólon humano HCT-8 (3) e LS180 (4); carcinoma de cérvix uterino humano HeLa (5) e SiHa (6); (7) carcinoma de mama humano MCF-7; (8) melanócitos murinos imortalizados melan A; (9) leucemia mielóide aguda humana HL-60.

A partir do RNA total de cada linhagem foi sintetizado um cDNA, e a qualidade dessa síntese foi verificada através de amplificação com *primers* específicos para α -actina murina e humana por RT-PCR. Os mesmos *primers* foram utilizados para

amplificação de controles constitutivos nos ensaios de detecção da expressão do gene da PCDH β 13 (Figura 10).

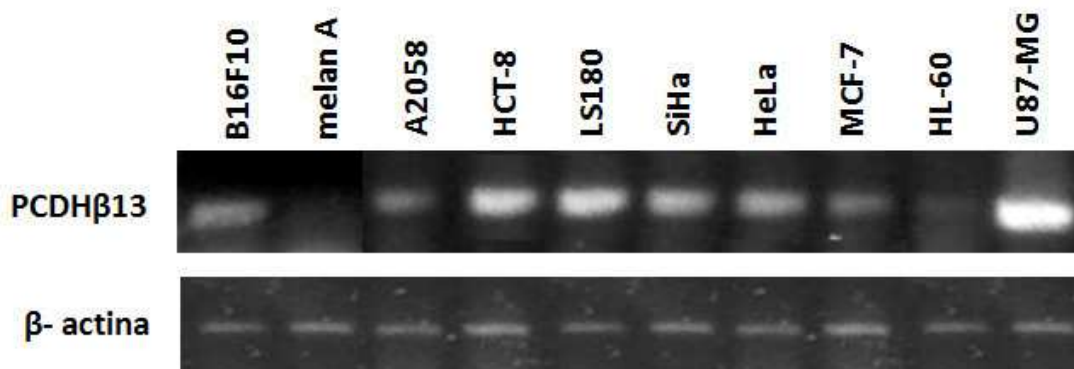


Figura 10. Análise da expressão do mRNA da PCDH β 13 em linhagens tumorais murinas e humanas. *Primers* específicos para PCDH β 13 e β -actina foram utilizados para amplificação dos respectivos genes em ensaio de RT-PCR, como descrito em Materiais e Métodos. *Linhagens utilizadas:* melanoma murino B16F10-Nex2.1; melanócitos murinos imortalizados melan A; melanoma humano A2058; carcinoma de cólon humano HCT-8 e LS180; carcinoma de cérvix uterino humano HeLa e SiHa; carcinoma de mama humano MCF-7; leucemia mielóide aguda humana HL-60; glioblastoma humano U87-MG.

Verificou-se que, enquanto todas as linhagens tumorais murinas e humanas analisadas expressam o mRNA de PCDH β 13, a linhagem de melanócitos murinos imortalizados (melan A) não expressa o mRNA dessa proteína. Embora não tenha sido possível a comparação quantitativa absoluta da expressão do gene nas diferentes linhagens celulares devido às limitações da técnica utilizada, a linhagem de leucemia pró-mielocítica humana HL-60 apresenta níveis muito baixos de expressão da molécula-alvo do mAb A4, enquanto a linhagem tumoral de glioblastoma humano U87-MG apresentou os mais altos níveis de mRNA para a mesma molécula.

A confirmação da identidade do produto obtido nos ensaios de RT-PCR com a PCDH β 13 humana foi realizada através de seqüenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, sendo utilizado o fragmento obtido a partir da linhagem HCT-8. Primeiramente, a qualidade do cromatograma foi analisada e confirmada com o Software BioEdit (dados não mostrados). Em seguida, as seqüências direta e reversa do fragmento de 364 pb obtido no ensaio de RT-PCR foi comparada à seqüência do gene da PCDH β 13 humana depositada no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) do *National Institute of Health* (NIH), utilizando o programa BLAST disponibilizado pelo mesmo (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A análise do fragmento se encontra descrita na Tabela 6. A alta identidade, 97 e 98%, observada respectivamente entre as seqüências direta e reversa do fragmento obtido por RT-PCR com o gene da PCDH β 13 humana, demonstram a presença dessa proteína nas células tumorais analisadas. Não foram encontradas mutações em nenhuma das seqüências analisadas.

Tabela 6. Resultado da análise pelo programa BLAST das seqüências direta e reversa do fragmento gerado a partir do RNA total obtido da linhagem tumoral HCT-8 por RT-PCR com *primers* específicos para a PCDH β 13 humana.

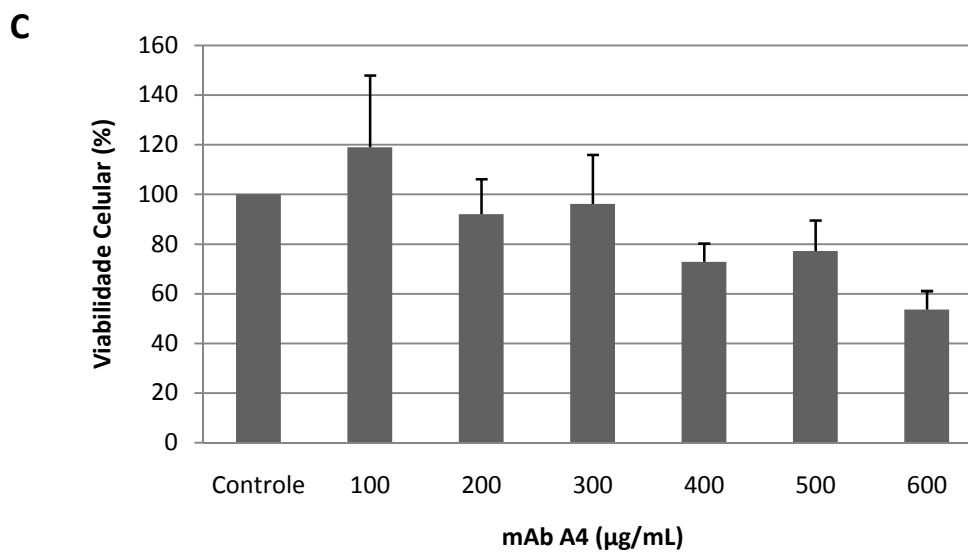
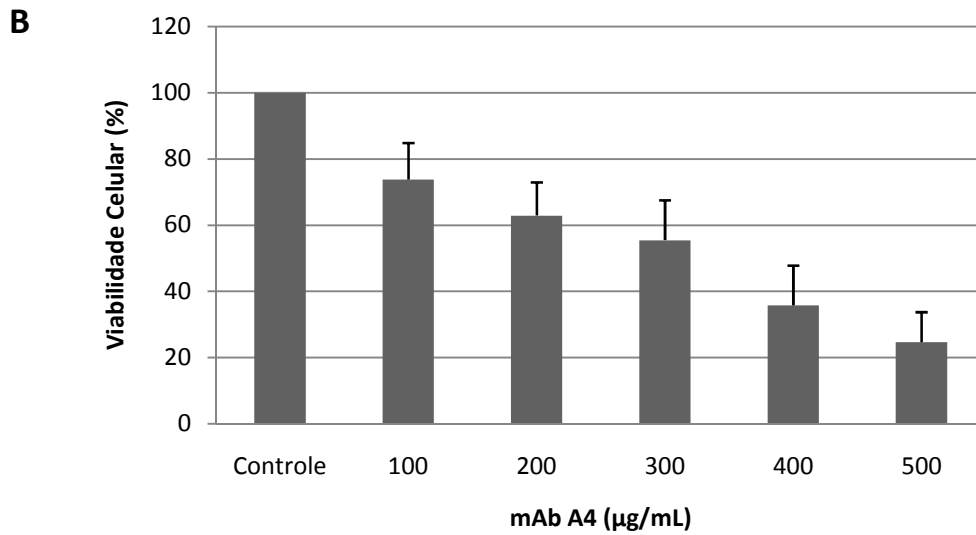
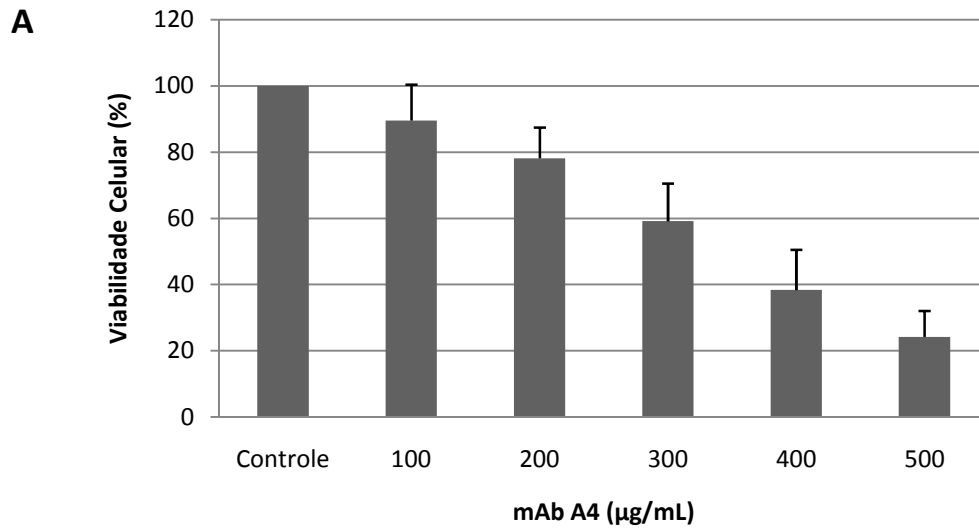
Seqüência	Número de acesso no NCBI	Descrição	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Direta	NM_018933.2	Homo sapiens protocadherin beta 13 (PCDHB13), mRNA	490	490	93%	4e-136	97%
Reversa	NM_018933.2	Homo sapiens protocadherin beta 13 (PCDHB13), mRNA	588	588	97%	1e-165	98%

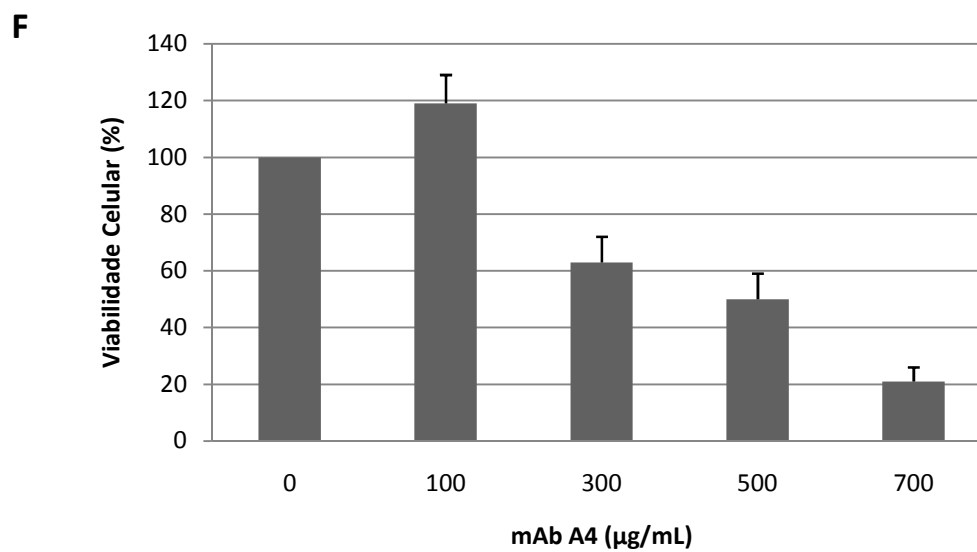
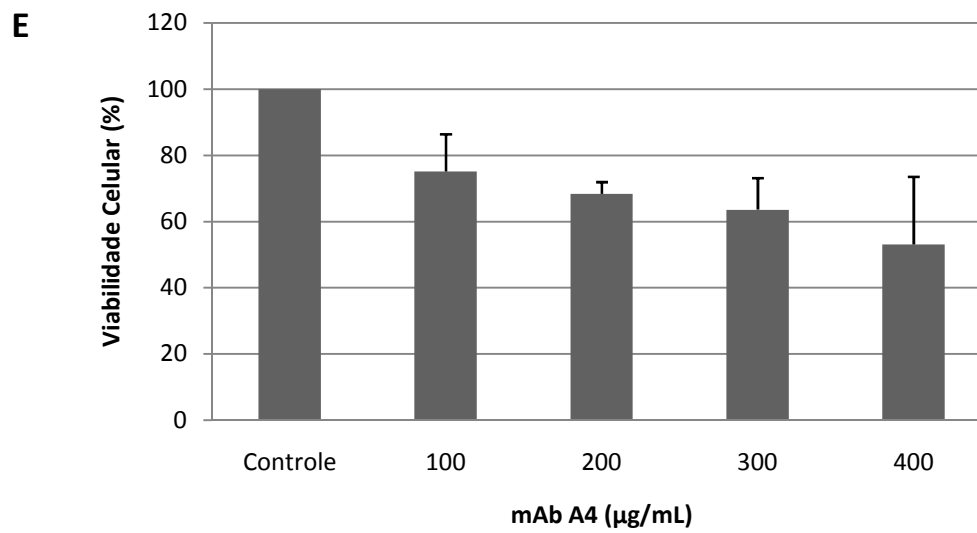
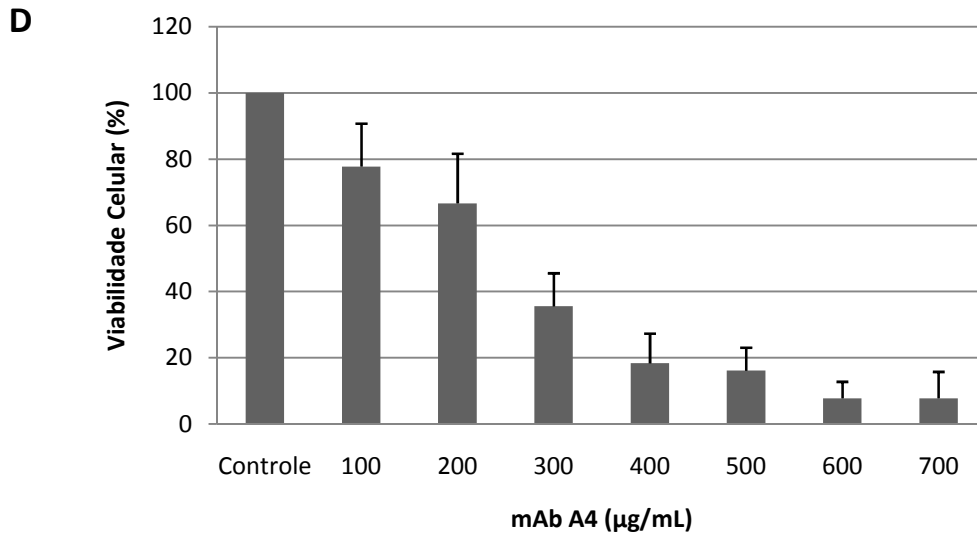
4.3.2. Análise da expressão da proteína PCDH β 13

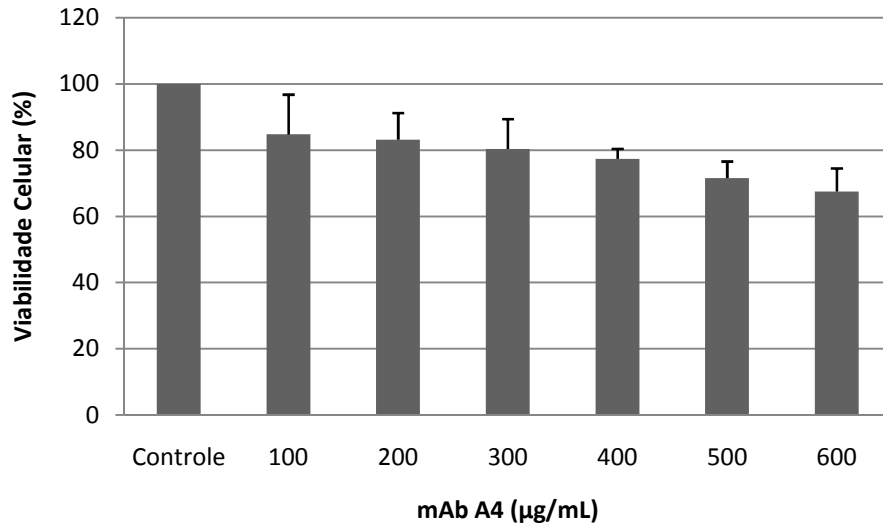
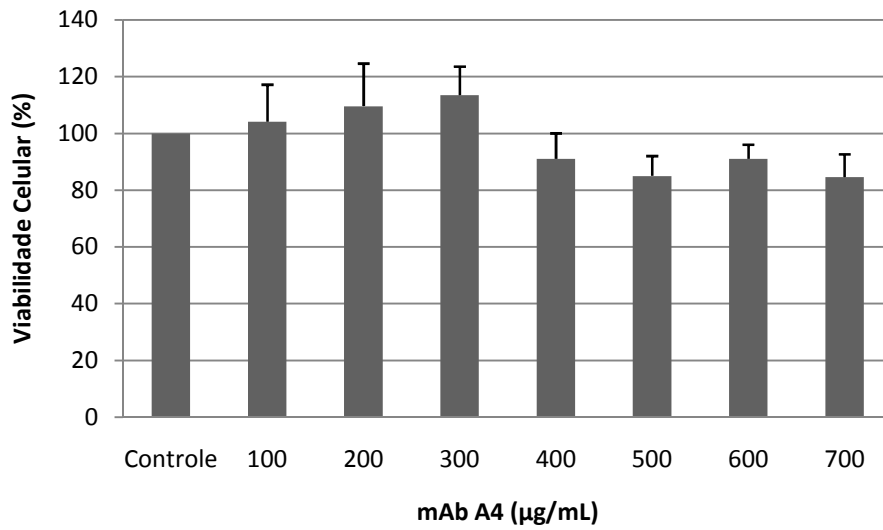
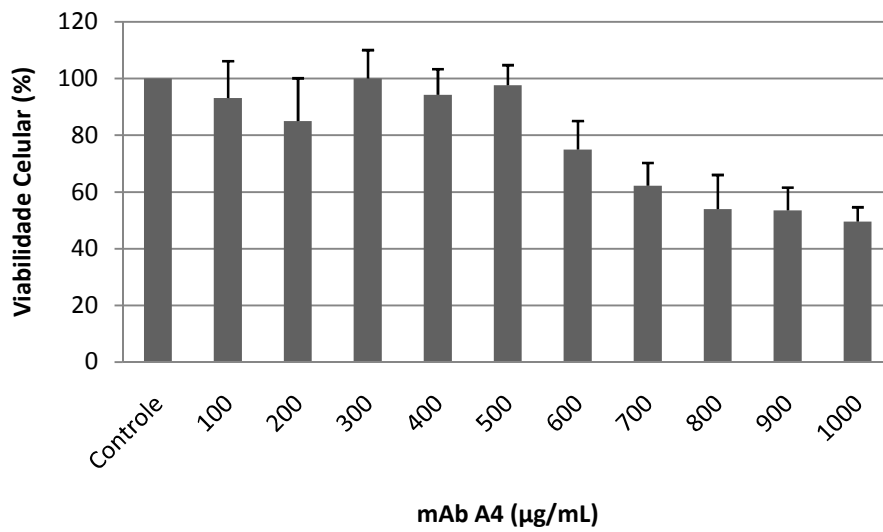
A análise da tradução do mRNA da PCDH β 13 em proteína nas diferentes linhagens tumorais humanas e murinas encontra-se representada na Figura 7. Das células tumorais humanas onde o mRNA foi detectado, somente na linhagem de carcinoma de mama MCF-7 não houve a tradução deste para a proteína reconhecida pelo mAb A4. Concordando com a ausência de mRNA observada na Figura 10, a linhagem de melanócitos murinos imortalizados melan A não apresentou a expressão da proteína PCDH β 13, detectada pelo mAb A4 (Figura 7).

4.4. Citotoxicidade do mAb A4 independente do complemento sobre linhagens tumorais murinas e humanas

Dentre as 13 linhagens celulares testadas (Figura 11), quatro linhagens foram altamente susceptíveis à ação citotóxica direta do mAb A4, com valores de IC₅₀ (concentração inibitória 50%) que variaram de 288 a 470 μ g/mL: carcinoma de cólon humano LS180 (288 μ g/mL), melanoma humano A2058 (312 μ g/mL), melanoma murino B16F10-Nex2.1 (346 μ g/mL), e glioblastoma humano U87-MG (470 μ g/mL). As linhagens tumorais HCT-8 (carcinoma de cólon humano), SiHa (carcinoma de cérvix uterino) e HL-60 (leucemia mielóide aguda humana) foram sensíveis à ação do mAb A4, e apresentaram valores de IC₅₀ próximos às máximas concentrações utilizadas no ensaio. As linhagens MCF-7 e SKBR-3 (adenocarcinomas de mama humano), e a linhagem de melanócitos murinos imortalizados melan A não foram sensíveis à ação do mAb A4, reduzindo apenas 15 a 25% da viabilidade celular nas concentrações mais altas utilizadas, de 600 e 700 μ g/mL do anticorpo.





G**H****I**

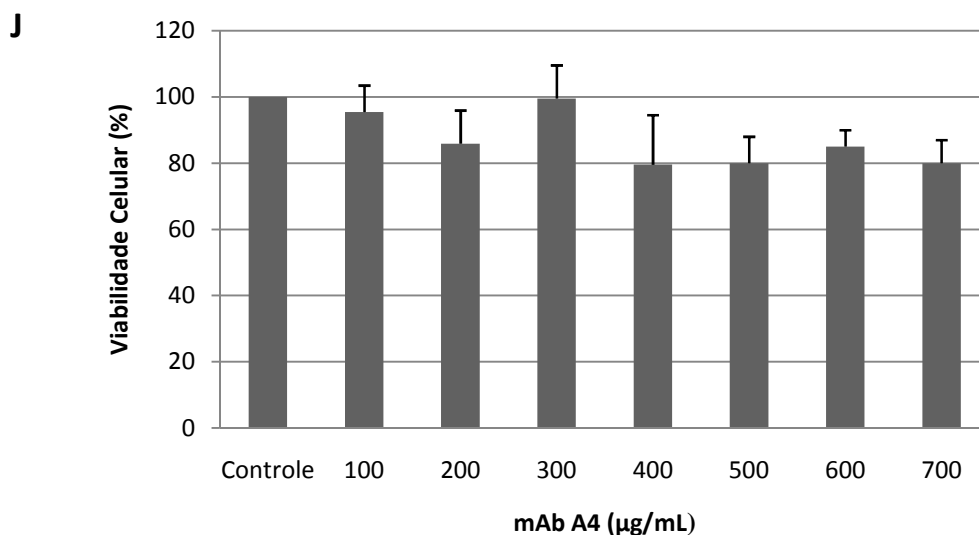


Figura 11. Citotoxicidade do mAb A4 independente do complemento sobre linhagens tumorais murinas e humanas. Diferentes concentrações do mAb A4 foram incubadas por 18h com as células tumorais e o número de células viáveis após esse tempo foi determinado como descrito em Materiais e Métodos. (A) melanoma murino B16F10-Nex2.1; (B) melanoma humano A2058; (C) carcinoma de cólon humano HCT-8; (D) carcinoma de cólon humano LS180; (E) carcinoma de cérvix uterino humano SiHa; (F) glioblastoma humano U87-MG; (G) carcinoma de mama humano MCF-7; (H) carcinoma de mama humano SKBR-3; (I) leucemia mielóide aguda humana HL-60; e (J) melanócitos murinos imortalizados melan A. O crescimento celular na ausência do mAb A4 foi considerado como 100% (Controle). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da média de viabilidade de três experimentos independentes.

Na Tabela 7, encontra-se um resumo dos resultados obtidos, relacionando o efeito citotóxico do mAb A4 com a presença do mRNA e da proteína PDH β 13 nas diferentes linhagens tumorais murinas e humanas testadas. Embora a Tabela ainda não esteja completa, nota-se uma tendência a uma correlação positiva entre a expressão da PCDH β 13 pelas células tumorais e a susceptibilidade ao efeito citotóxico independente de complemento do mAb A4. Isso fica mais evidente na ausência da expressão da PCDH β 13 na linhagem de melanócitos murinos imortalizados melan A e na sua resistência ao efeito do mAb A4 *in vitro*.

Tabela 7. Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) para o mAb A4, detecção de mRNA da Protocaderina β 13 (PCDH β 13) em ensaio de RT-PCR, e detecção da expressão da proteína PCDH β 13 em ensaio de *Immunoblotting* para as linhagens tumorais selecionadas. *ND*, não determinado.

Tipo de Tumor	Linhagem	IC ₅₀ (μ g/mL)	PCDH β 13	PCDH β 13
	Tumoral		mRNA	Proteína
Melanoma	B16F10-Nex2.1 murino	346	+	+
	A2058 humano	312	+	+
Cólon	HCT-8	> 600	+	+
	LS180	288	+	+
Cérvice	SiHa	> 400	+	+
Glioblastoma	U87-MG	470	+	ND
Mama	MCF-7	> 600	+	-
	SKBR-3	> 700	ND	ND
Leucemia	HL-60	> 1000	+	ND
Melanócitos imortalizados	melan A	> 700	-	-

4.5. Mecanismo de morte celular desencadeado pela interação entre o mAb A4 e PCDH β 13 em linhagens de melanoma murino e humano

4.5.1. Internalização do mAb A4

Em experimentos anteriores de Imunofluorescência Indireta de células tumorais previamente fixadas e posteriormente marcadas com o mAb A4, observamos que o anticorpo reconheceu a membrana plasmática de células de melanoma murino B16F10-Nex2.1 e humano A2058 (Figura 8). Alternativamente, células B16F10-Nex2.1 foram primeiramente incubadas com o mAb A4, posteriormente fixadas e observadas por microscopia confocal em colaboração com o Prof. Dr. Renato Arruda Mortara (Disciplina de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo), para determinar se o anticorpo seria internalizado pela célula tumoral.

Distintas concentrações do mAb A4 (50 e 500 $\mu\text{g/mL}$) foram incubadas por diferentes tempos (10 e 60 min) com células B16F10-Nex2.1. A concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ corresponde à concentração que desencadeia morte celular em apenas 4% das células após 18h de incubação com o mAb A4 (Figura 11), e foi escolhida por ser pouco eficiente na indução de morte celular, mas capaz de se ligar às células tumorais pré-fixadas e torná-las positivas em ensaio de Imunofluorescência Indireta (Figura 8, onde foram utilizados 30 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4). A concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ corresponde à concentração que desencadeia morte celular em 75% das células após 18h de incubação com o mAb A4 (Figura 11).

Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 12 a 14. As imagens correspondem aos diferentes planos de corte no eixo z da imagem tridimensional (3D).

Cada imagem foi numerada seqüencialmente em ordem crescente a partir da região dorsal (aquela que não se encontra em contato com a lamínula) para a região ventral (aquela que se encontra aderida à lamínula), e imagens representativas de quatro planos de corte distintos foram selecionadas.

Após 10 min de incubação com o mAb A4 observou-se fraca ligação do mAb na concentração de 50 µg/mL (dados não mostrados). Entretanto, anticorpos nessa concentração ligaram-se fortemente à célula tumoral após 60 min de incubação. Na Figura 12, observa-se a marcação do anticorpo na membrana plasmática (Imagens 09 a 14) e também em compartimentos intracelulares arredondados, em imagens sugestivas de vesículas endocíticas (Imagens 12 a 14).

Na Figura 13, observa-se que em 10 min de incubação com 500 µg/mL mAb A4, houve marcação da membrana plasmática (Imagens de 16 a 18) e intensa formação de vesículas endocíticas (Imagens 18 e 20). Com a utilização de 500 µg/mL de mAb A4 por 60 min (Figura 14) observou-se o mesmo resultado, intensa marcação da membrana plasmática (Imagens 12 e 17) e também aumento do número e da intensidade das vesículas endocíticas marcadas pelo mAb A4 (Imagens 19 e 21). Adicionalmente, observou-se que as células nessas condições de ensaio apresentavam-se arredondadas.

Esses resultados demonstram que o reconhecimento da molécula de superfície celular PCDHβ13 pelo mAb A4 induziu a internalização do complexo PCDHβ13 - mAb A4 em vesículas endocíticas. A identidade dessas vesículas ainda é desconhecida. De acordo com a literatura, moléculas de caderinas podem ser internalizadas por vesículas de clatrina, caveolina, *lipid rafts* ou por macropinocitose (Ivanov *et.al.*, 2004), e então, podem ser recicladas de volta à membrana plasmática ou degradadas em vesículas lisossomais (Delva & Kowalczyk, 2009).

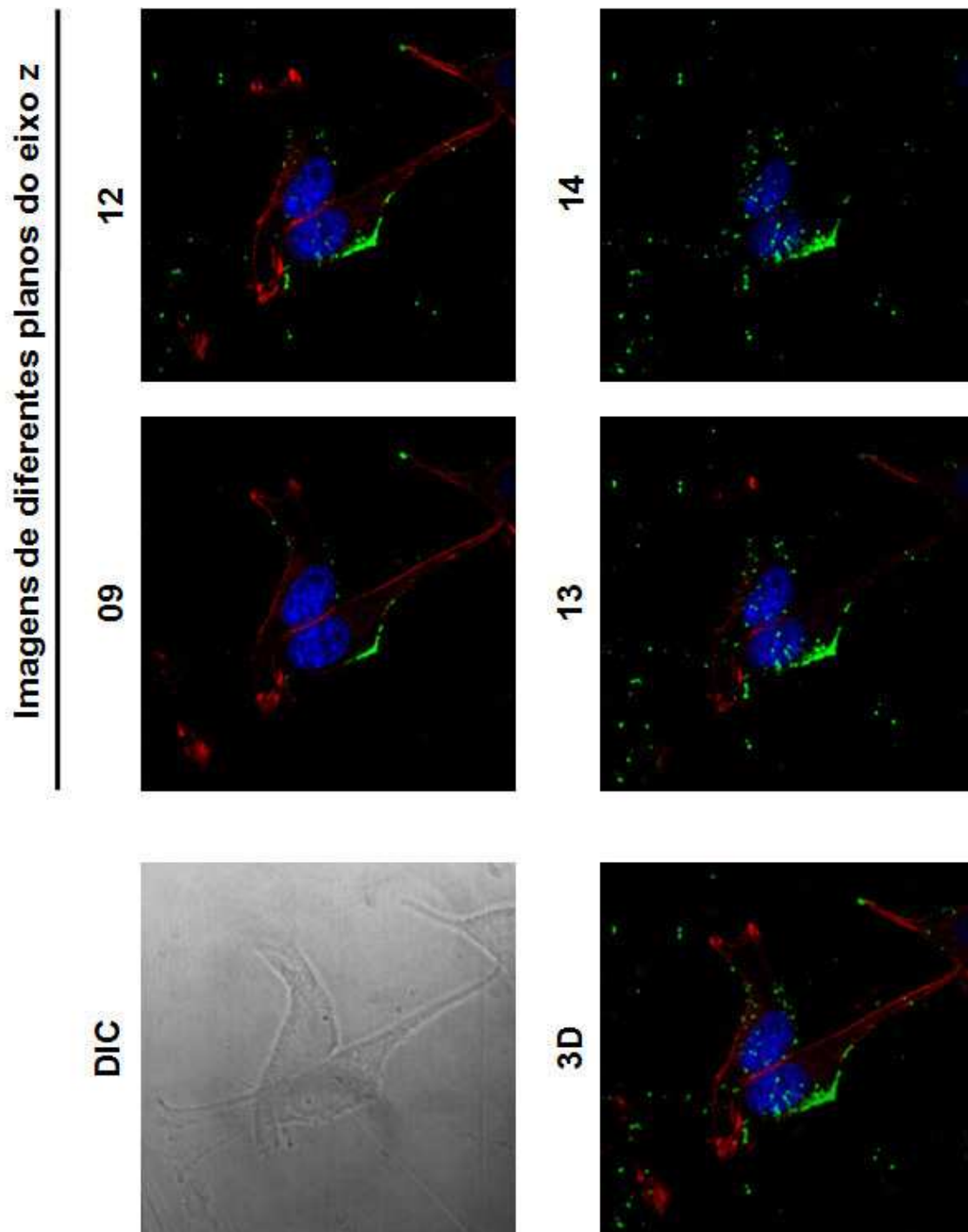


Figura 12. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas. Células B16F10-Nex2.1 foram incubadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4 por 60 min e analisadas por microscopia confocal. *Em azul:* DAPI (marcação de DNA). *Em vermelho:* Faloidina-Rodamina (marcação de actina). *Em verde:* mAb A4-AlexaFluor 488. *3D:* Imagem tridimensional. Foram capturadas 20 imagens de diferentes planos do eixo z, e estão representadas as imagens 09, 12, 13 e 14. DIC, *Differential Interference Contrast*. Aumentos de 1.000X.

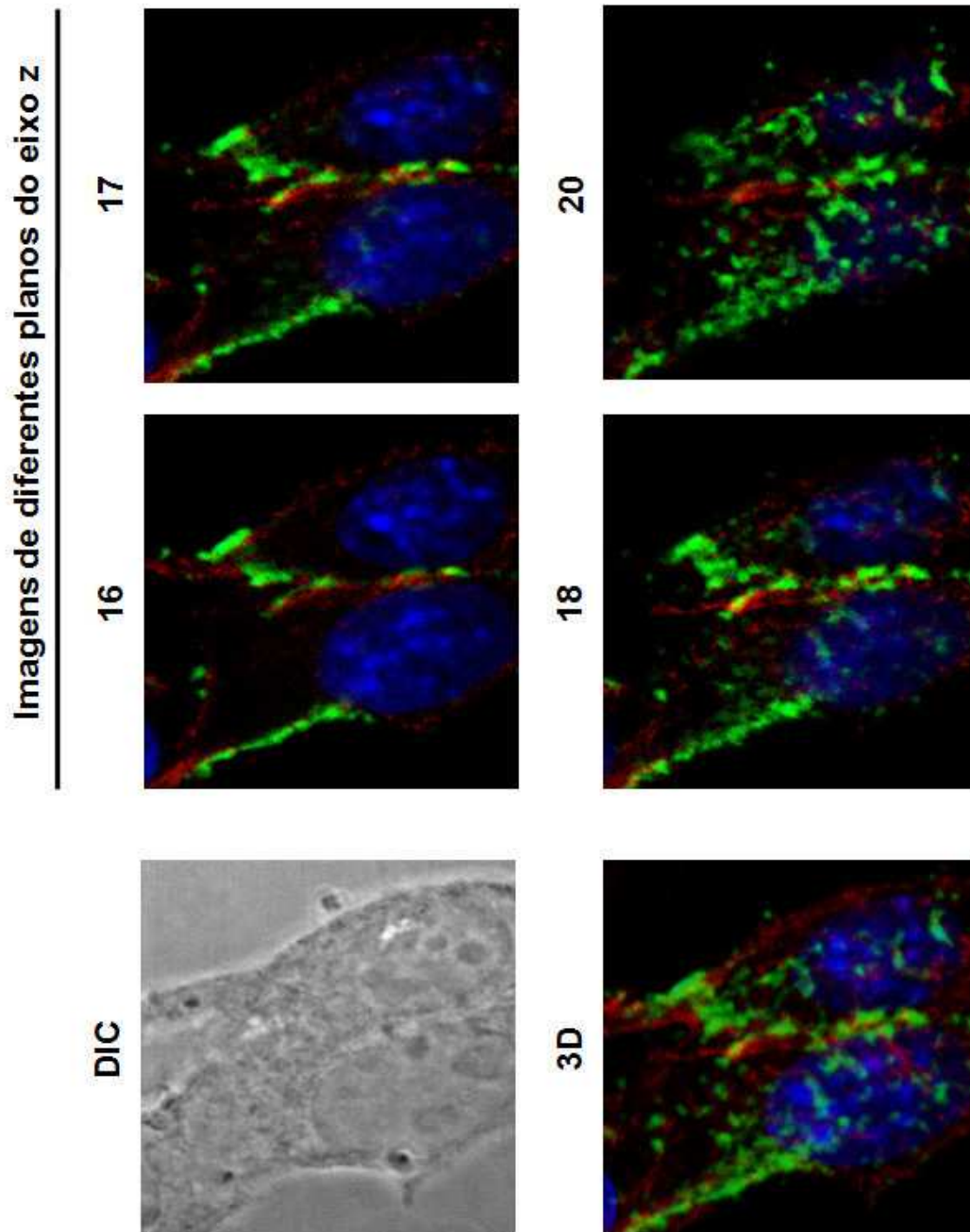


Figura 13. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas. Células B16F10-Nex2.1 foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb A4 por 10 min e analisadas por microscopia confocal. *Em azul:* DAPI (marcação de DNA). *Em vermelho:* Faloidina-Rodamina (marcação de actina). *Em verde:* mAb A4-AlexaFluor 488. *3D:* Imagem tridimensional. Foram capturadas 24 imagens de diferentes planos do eixo z e estão representadas as imagens 16, 17, 18 e 20. DIC, *Differential Interference Contrast*. Aumentos de 2.300X.

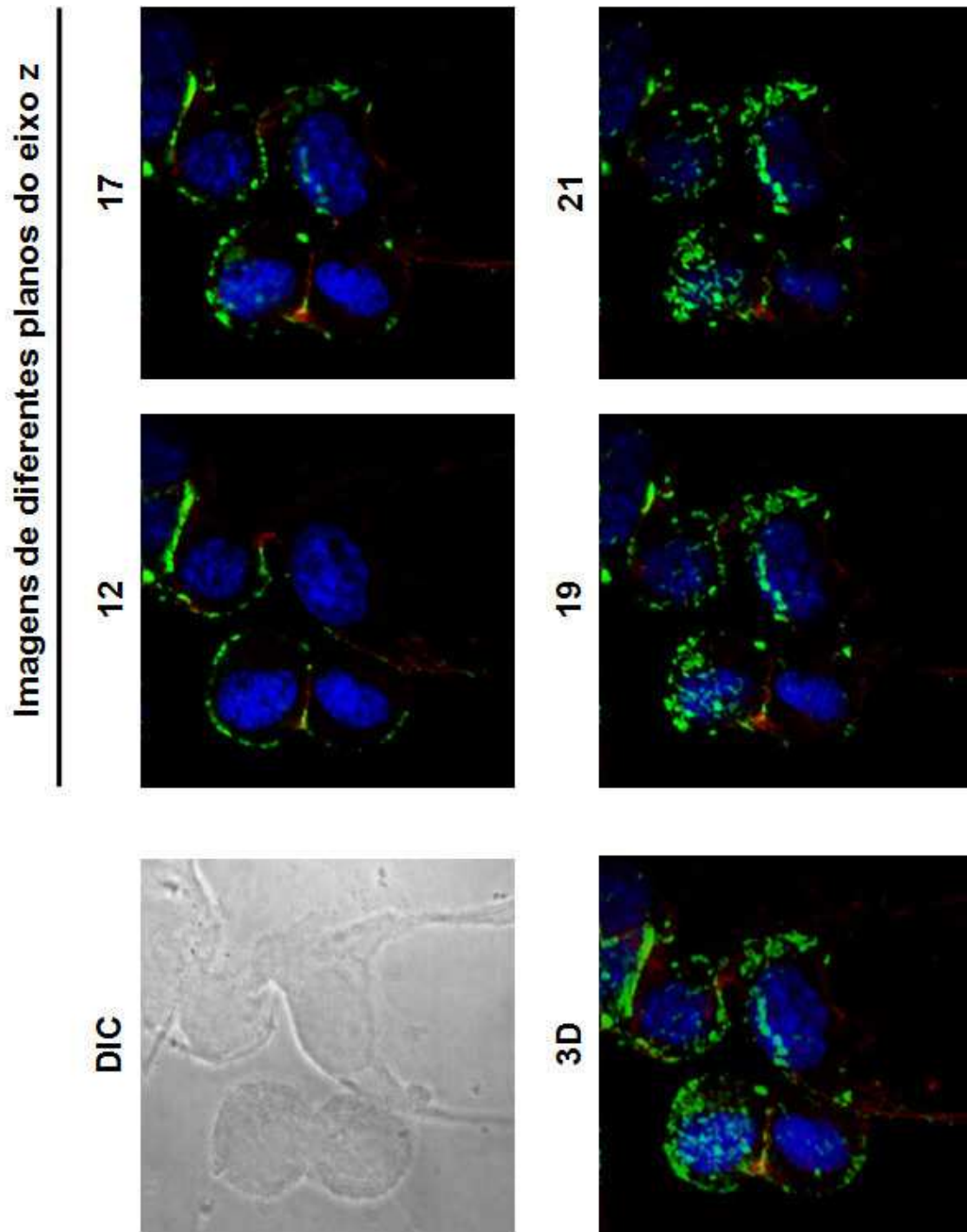


Figura 14. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas. Células B16F10-Nex2.1 foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb A4 por 60 min e analisadas por microscopia confocal. *Em azul:* DAPI (marcação de DNA). *Em vermelho:* Faloidina-Rodamina (marcação de actina). *Em verde:* mAb A4-AlexaFluor 488. *3D:* Imagem tridimensional. Foram capturadas 27 imagens de diferentes planos do eixo z e estão representadas as imagens 12, 17, 19 e 21. DIC, *Differential Interference Contrast*. Aumentos de 1.000X.

Em seguida, avaliamos se o mAb A4 internalizado em vesículas endocíticas era direcionado aos lisossomos para degradação. Células B16F10-Nex2.1 foram incubadas com 500 µg/mL de mAb A4 por 60 min e, em seguida, com um anticorpo monoclonal que reconhece o marcador lisossomal LAMP-1. As imagens mostradas na Figura 15 correspondem aos diferentes planos de corte no eixo z da imagem tridimensional (3D). Cada imagem foi numerada seqüencialmente em ordem crescente a partir da região dorsal para a região ventral, e imagens representativas de dois planos de corte distintos foram selecionadas.

A Imagem 14 na Figura 15 é representativa de um corte mais próximo à superfície celular, na qual o mAb A4 reconheceu em cada célula a região da membrana plasmática que não interagiu com as demais células do grupo celular mostrado. O anticorpo anti-LAMP-1 reconheceu os lisossomos no citoplasma. Na Imagem 18, um corte mais distante da superfície celular e mais próximo do núcleo, as vesículas contendo o mAb A4 não co-localizam com lisossomos detectados com o anticorpo anti-LAMP-1. A Imagem 18' é um aumento de 3,8 vezes da região delimitada pelo quadro na Imagem 18. Nessas imagens, verificou-se que também não houve co-localização das vesículas contendo o mAb A4 com os lisossomos, demonstrando que o mAb A4 no tempo analisado não está presente em vesículas lisossomais.

Esses resultados demonstram que o complexo PCDHβ13-mAb A4 não é direcionado aos lisossomos para degradação após a internalização. Possivelmente, o complexo é reciclado à membrana plasmática. Experimentos adicionais são necessários para determinar a identidade e o destino da vesícula endocítica contendo o complexo PCDHβ13-mAb A4.

Imagens de diferentes planos do eixo z

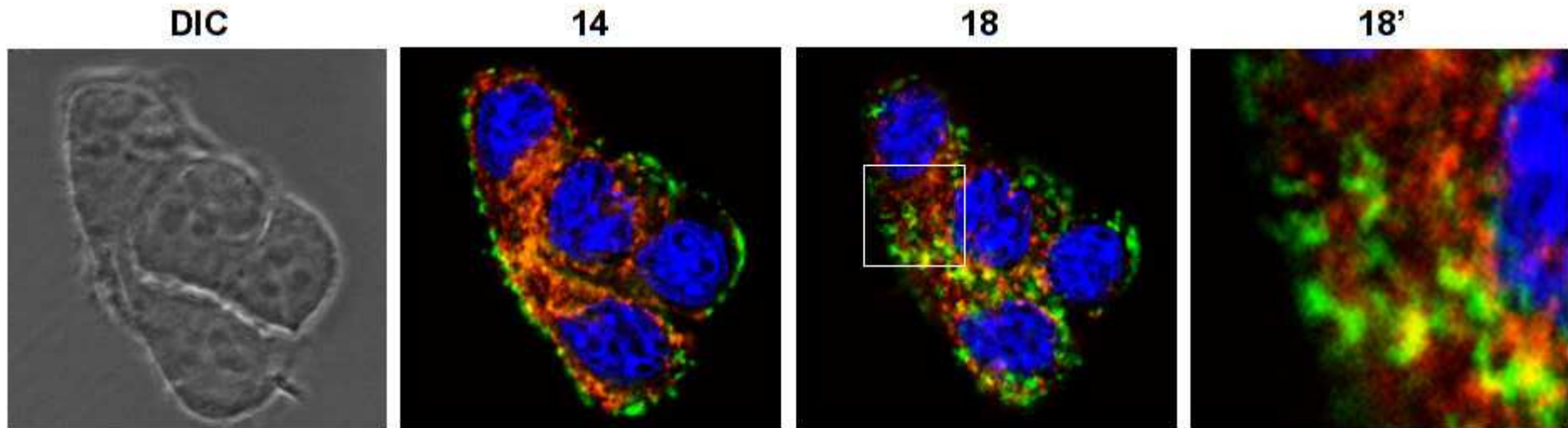


Figura 15. mAb A4 reconhece a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 e é internalizado em vesículas endocíticas não-lisossomais. Células B16F10-Nex2.1 foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb A4 por 60 min e analisadas por microscopia confocal. *Em azul:* DAPI (marcação de DNA). *Em vermelho:* anti-LAMP-1 (marcação de lisossomos). *Em verde:* mAb A4-AlexaFluor 488. As imagens correspondem à co-localização das imagens individuais. Foram capturadas 35 imagens de diferentes planos do eixo z e estão representadas as imagens 14 e 18. Aumentos de 1.000X. A imagem 18' representa um aumento de 3,8 vezes do quadro delimitado na imagem 18. DIC, *Differential Interference Contrast*.

4.5.2. Exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática

Utilizando alguns ensaios recomendados pelo *Nomenclature Committee on Cell Death* (Kroemer *et. al.*, 2009), buscou-se determinar qual o tipo de morte celular desencadeada pela interação entre o mAb A4 e PCDH β 13 na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1.

A apoptose é um processo caracterizado por mudanças morfológicas e bioquímicas que levam a célula à morte. Um dos eventos que ocorrem durante a morte celular por apoptose é a externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática para a sinalização de fagocitose (Taylor *et.al.*, 2008), e essa exposição da fosfatidilserina na membrana celular pode ser acompanhada pela sua ligação com a molécula de Anexina-V conjugada ao fluoróforo FITC.

A verificação da exposição da fosfatidilserina em células de melanoma murino B16F10-Nex2.1 após o tratamento com 400 μ g/mL de mAb A4 por 18h foi realizada com o *Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma), conforme descrito em Materiais e Métodos. Na Figura 16, observa-se que o tratamento de células B16F10-Nex2.1 com o mAb A4 ocasionou um aumento de 1,42 vezes no número de células marcadas com Anexina-V-FITC (Anexina⁺), sugerindo que a interação entre o mAb A4 e PCDH β 13 seja um estímulo apoptótico para as células tumorais.

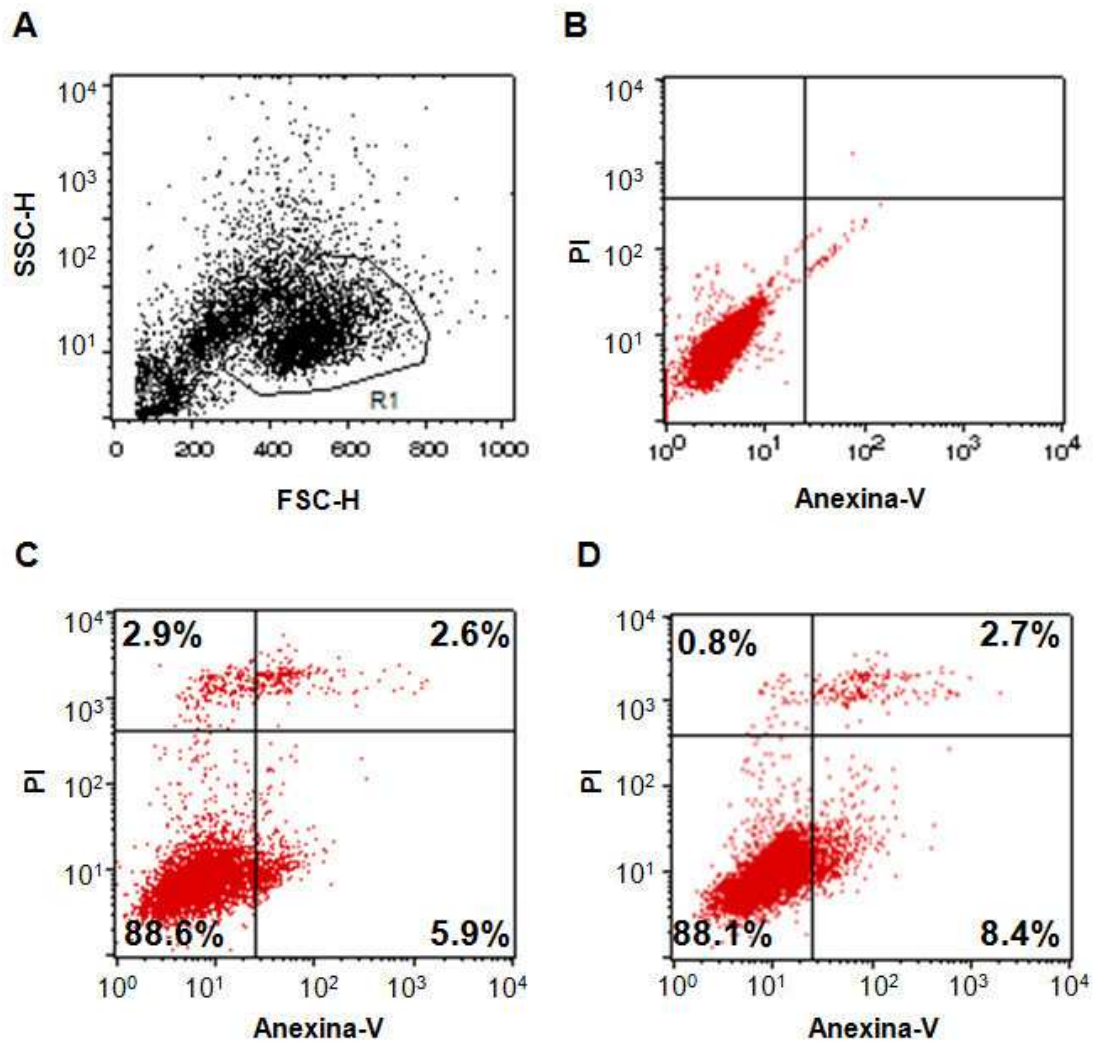


Figura 16. Exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática induzida pelo tratamento do melanoma murino B16F10-Nex2.1 com mAb A4. 1×10^6 células foram incubadas com $400 \mu\text{g/mL}$ de mAb A4 por 18h. **A)** Dot-plot dos parâmetros SSC *versus* FSC (tamanho e granulosidade celular, respectivamente) e **(B)** Dot-plot dos parâmetros Anexina-V-FITC *versus* PI, das células não tratadas e não coradas com Anexina-V-FITC e PI (iodeto de propídeo). **C)** Controle, células não tratadas e coradas com Anexina-V-FITC e PI. **D)** Células tratadas com mAb A4 e coradas com Anexina-V-FITC e PI.

Como sugerido pelo *Nomenclature Committee on Cell Death* (Kroemer *et. al.*, 2009), o processo de morte celular deve ser analisado por pelo menos três diferentes métodos, e desta forma avaliamos também a ativação de caspases, a geração de espécies

reativas de oxigênio, e as alterações nucleares observadas nas células tumorais tratadas com o mAb A4.

4.5.3. Ativação de caspases

A morte celular por apoptose é caracterizada pela ativação de caspases, enzimas que são responsáveis pela maioria dos eventos morfológicos e bioquímicos que caracterizam o processo apoptótico. As caspases estão inativas em células saudáveis, mas são rapidamente ativadas após estímulos apoptóticos. A ativação das caspases iniciadoras, caspase-8 e -9, determina qual via de morte celular será ativada: via extrínseca (caspase-8) ou via intrínseca (caspase-9). Independentemente da caspase iniciadora ativada, ambas as vias levam à ativação das principais caspases efetoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7) (Taylor *et.al.*, 2008).

O ensaio para detecção da ativação de caspases após o tratamento de células de melanoma murino B16F10-Nex2 com 400 µg/mL de mAb A4 por 18h foi realizado com o *ApoTarget Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit* (Invitrogen), conforme descrito em Materiais e Métodos. Nesse ensaio, a atividade enzimática é quantificada pela clivagem de substrato específico por cada caspase ativada após o tratamento com o mAb A4.

Como pode ser observado na Figura 17, o tratamento com mAb A4 induziu a ativação da caspase-9 (aumento de 1,53 vezes na quantidade de substrato específico clivado) e das caspases efetoras -3 (aumento de 1,49 vezes) e -6 (aumento de 1,45 vezes). O resultado obtido sugere que o efeito apoptótico induzido pelo mAb A4 em células tumorais ocorra através da ativação da via intrínseca (ou mitocondrial) de morte celular.

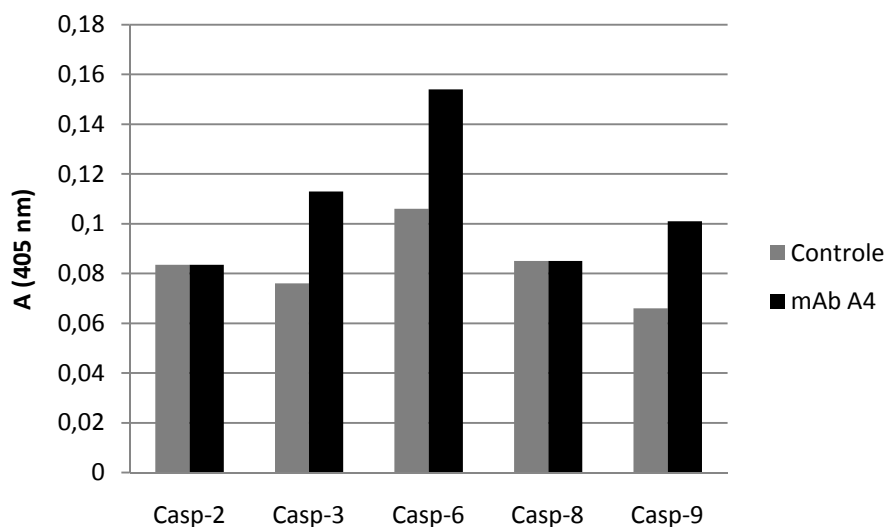


Figura 17. mAb A4 induz ativação das caspases-9, -3 e -6 no melanoma murino B16F10-Nex2.1. Células da linhagem tumoral B16F10-Nex2 foram incubadas por 18h com 400 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4, e a ativação de caspases-2, -3, -6, -8 e -9 foi quantificada em ensaio colorimétrico utilizando substratos específicos conforme descrito em Materiais e Métodos. *Controle*, células não incubadas com o mAb A4.

4.5.4. Geração de espécies reativas de oxigênio

Como descrito no item 4.5.3, o tratamento de células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 com 400 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4 por 18h ocasionou a ativação da caspase-9, importante molécula da via mitocondrial de morte celular por apoptose.

O processo de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria é o principal evento celular gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como íons superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), hipoclorito (H^+OCl) e oxigênio singlete (Palmiere *et. al*, 2009). O aumento da atividade mitocondrial ocasiona o aumento da geração de ROS e, alguns dos compostos gerados, como por exemplo, íons superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) possuem alta propensão a reagir com DNA, aminoácidos, proteínas e lipídios de membranas. Os danos celulares podem desencadear dois processos: (1) Interrupção do ciclo celular para

reparo do DNA ou (2) Apoptose mediada pela proteína supressora tumoral p53 (De Gruijl *et. al.*, 2001; Sulaimon & Kitchell, 2003).

Verificamos, então, se o tratamento com o mAb A4 poderia interferir com a produção de ROS em células do melanoma murino B16F10-Nex2.1. O corante oxidativo fluorescente *dihydroethidium* (DHE) foi utilizado para avaliar a produção intracelular de íons superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O corante DHE é permeável à célula e reage com íons superóxido para formar etídeo, que se intercala no DNA e dá origem a uma fluorescência vermelha nos comprimentos de excitação de 520 nm e de emissão de 610 nm (Mezhybovska *et.al.*, 2009).

Células B16F10-Nex2.1 foram tratadas com 400 μ g/mL de mAb A4 por 1h, 3h, 6h ou 18h e avaliadas para a geração de íons superóxido com o corante DHE (Figura 18), conforme descrito em Materiais e Métodos. Células tratadas com 5 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 20 min foram utilizadas como controle positivo, nas quais observou-se aumento da intensidade de fluorescência nuclear, e aumento da fragmentação nuclear e celular quando comparadas às células controle não-tratadas. Verificou-se que após 3h de incubação com o mAb A4, houve um aumento da intensidade de fluorescência nuclear comparável àquela induzida pelo tratamento com H_2O_2 no controle positivo. Com 6h de incubação com o mAb A4 foram observadas regiões de condensação da cromatina (setas brancas), e com 18h de incubação houve diminuição da intensidade de fluorescência nuclear, com aumento da condensação da cromatina (setas brancas).

Esses resultados confirmam a participação da mitocôndria no processo de morte celular desencadeado pelo mAb A4 através da geração de íons superóxido, que podem causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos e desencadear a indução da morte celular através da ativação da proteína supressora tumoral p53.

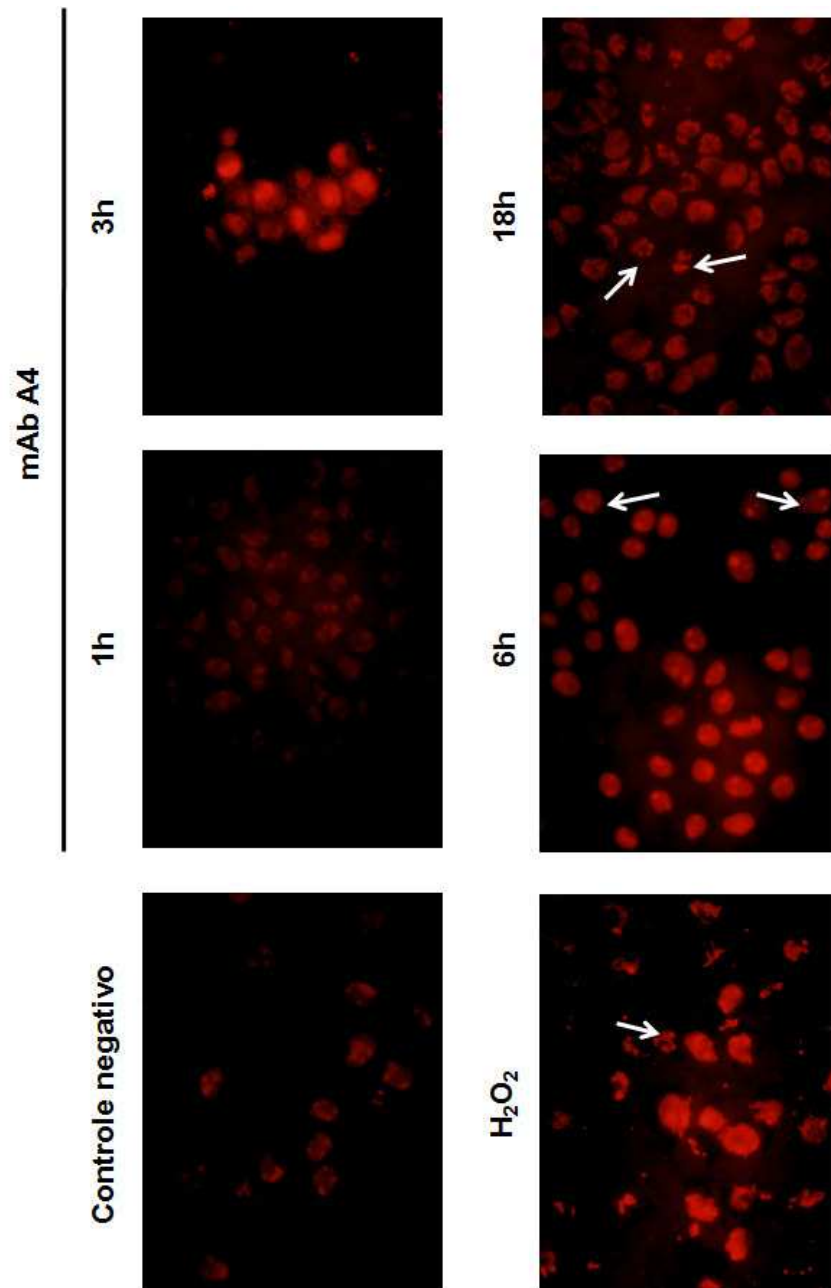


Figura 18. mAb A4 induz a produção de íons superóxido no melanoma murino B16F10-Nex2.1. Células da linhagem tumoral B16F10-Nex2 foram incubadas por 1h, 3h, 6h ou 18h com 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb A4, e a produção de íons superóxido foi avaliada pela fluorescência gerada após reação com o corante DHE, conforme descrito em Materiais e Métodos. *Controle negativo*, células não tratadas. *Controle positivo*, células incubadas com 5 mM H_2O_2 por 20 min. *Setas brancas*, regiões de condensação da cromatina. Aumentos de 600x.

4.5.5. Condensação da cromatina

Os eventos nucleares que caracterizam a apoptose são a condensação da cromatina e a degradação do DNA durante os últimos estágios desse processo de morte celular (Taylor *et.al.*, 2008; Kroemer *et. al.*, 2009).

Na Figura 19, pode-se observar que o tratamento com 400 µg/mL de mAb A4 por 18h induziu a condensação da cromatina na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 e nas linhagens humanas de melanoma (A2058) e carcinoma de cólon (HCT-8), como observado após a incubação das células tumorais tratadas com o corante fluorescente Hoechst 33258, que se liga ao DNA celular. Na linhagem de glioblastoma humano (U87-MG), o tratamento com o mAb A4 induziu a fragmentação nuclear. Não foram observadas alterações na condensação da cromatina e na morfologia nuclear na linhagem de carcinoma mamário humano SKBR-3 (dados não mostrados).

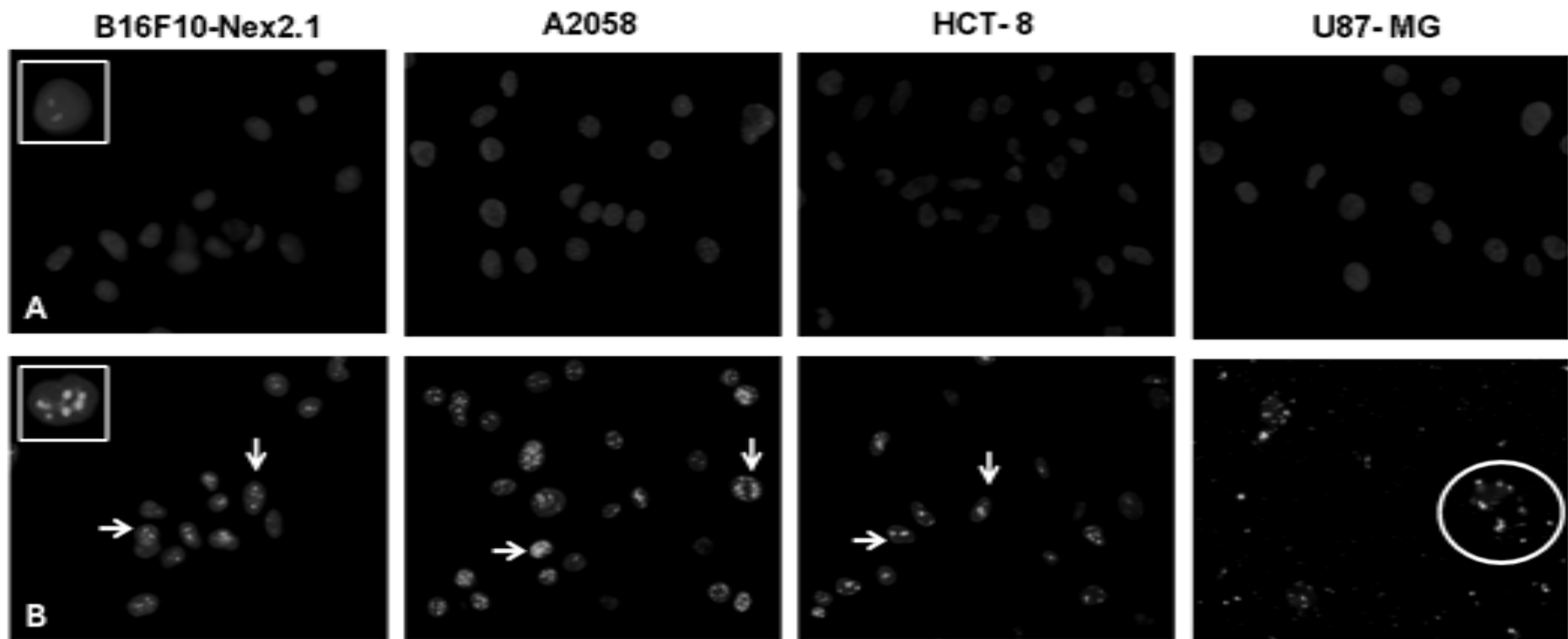


Figura 19. mAb A4 induz condensação da cromatina e a fragmentação nuclear em células tumorais murinas e humanas. As células tumorais foram tratadas com 400 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4 por 18h e coradas com Hoechst 33258 , como descrito em Materiais e Métodos. A cromatina condensada é visualizada como regiões de maior intensidade luminosa (setas brancas) e as regiões de fragmentação nuclear estão destacadas por círculos brancos. *Linhagens utilizadas:* melanoma murino B16F10-Nex2.1; melanoma humano A2058; carcinoma de cólon humano HCT-8; e glioblastoma humano U87-MG. *Controle,* células não incubadas com o mAb A4. *Aumento:* 600x. Os insertos representam aumento de 1,4 vezes da figura original.

4.5.6. Degradação oligonucleossomal do DNA

No processo de apoptose, a ativação das caspases efetoras leva à ativação de outras enzimas celulares, e entre elas, enzimas específicas responsáveis pela degradação oligonucleossomal do DNA, gerando fragmentos que variam de tamanho em 200 pares de bases, também denominado de *DNA ladder* (Taylor *et.al.*, 2008; Kroemer *et.al.*, 2009).

Células tumorais murinas e humanas foram tratadas com 400 µg/mL de mAb A4 por 18h e em seguida seu DNA total foi extraído e separado eletroforéticamente como descrito em Materiais e Métodos. O tratamento com o mAb A4 induziu a degradação oligonucleossomal na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 e nas linhagens humanas de melanoma (A2058) e carcinoma de cólon (HCT-8). Não foi observado esse padrão de degradação do DNA na linhagem de carcinoma de mama (SKBR-3) (Figura 20), e nas linhagens tumorais humanas de glioblastoma (U87-MG) e leucemia mieloide aguda (HL-60) (dados não mostrados).

Os resultados obtidos neste experimento corroboram os experimentos de avaliação da citotoxicidade do mAb A4 (Figura 11 e Tabela 7) e de verificação da condensação da cromatina após coloração com o corante fluorescente Hoechst (Figura 19). Células que são sensíveis à ação citotóxica do anticorpo e cuja cromatina é condensada após o tratamento com o mAb A4 (B16F10-Nex2.1, A2058 e HCT-8) também apresentam o DNA fragmentado em padrão típico de um processo apoptótico. Da mesma forma, a linhagem de tumor de mama humano SKBR-3, que não é sensível à ação do mAb A4, não apresenta a cromatina condensada (dados não mostrados) nem tampouco a degradação do DNA após tratamento com o mAb (Figura 20).

A linhagem de glioblastoma humano U87-MG apresentou pronunciada fragmentação nuclear após tratamento com o mAb A4 (Figura 19). A desintegração celular impediu a recuperação e detecção de fragmentos de 200 pb de DNA com o método utilizado, sugerindo que o processo de morte celular induzido pelo mAb A4 em diferentes células possa apresentar algumas características singulares.

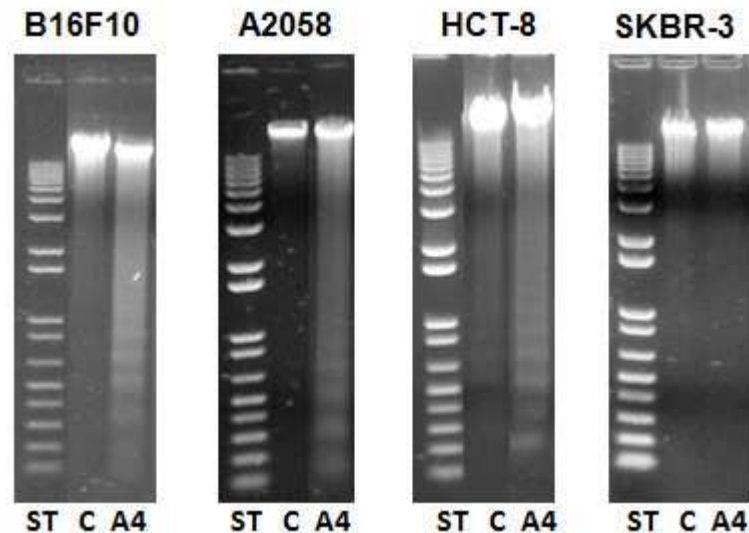


Figura 20. mAb A4 induz degradação oligonucleossomal de DNA em linhagens tumorais murinas e humanas. Células de melanoma murino B16F10-Nex2 e células tumorais humanas de melanoma (A2058), carcinoma de cólon (HCT-8) e carcinoma de mama (SKBR-3) foram incubadas por 18h com 400 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4. Após a incubação, o DNA total das células foi extraído e separado eletroforéticamente como descrito em Materiais e Métodos. *C*: Controle negativo, células não tratadas. *ST*: Padrão de peso molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

A degradação oligonucleossomal do DNA induzida pelo tratamento com o mAb A4 foi também avaliada por um segundo método. Foi utilizado o ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), com o *In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein* (Roche) em colaboração com o Prof. Dr. Renato Arruda Mortara (Disciplina de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo).

A clivagem do DNA genômico durante a apoptose gera fragmentos de pequeno peso molecular (200 pb) com extremidades 3'-OH livres. Essas extremidades são identificadas no método de TUNEL pela incorporação de nucleotídeos modificados marcados com o fluoróforo fluoresceína em uma reação enzimática catalisada pela *Terminal deoxynucleotidil transferase* (TdT). A fluoresceína incorporada nos nucleotídeos polimerizados pode então ser detectada em microscopia de fluorescência.

Células tumorais murinas e humanas foram tratadas com 400 µg/mL de mAb A4 por 18h e submetidas ao método de TUNEL, conforme descrito em Materiais e Métodos. Células da linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 (Figura 21) e das linhagens humanas de melanoma (A2058) (Figura 22) e carcinoma de cólon (HCT-8) (Figura 23) foram positivas no ensaio de TUNEL. Pode-se observar que 100% das células são positivas no ensaio. Como controle positivo das reações, utilizou-se 1 µg/mL de Actinomicina D, já estabelecido estímulo apoptótico.

Os resultados obtidos corroboraram os resultados do experimento mostrado na Figura 20.

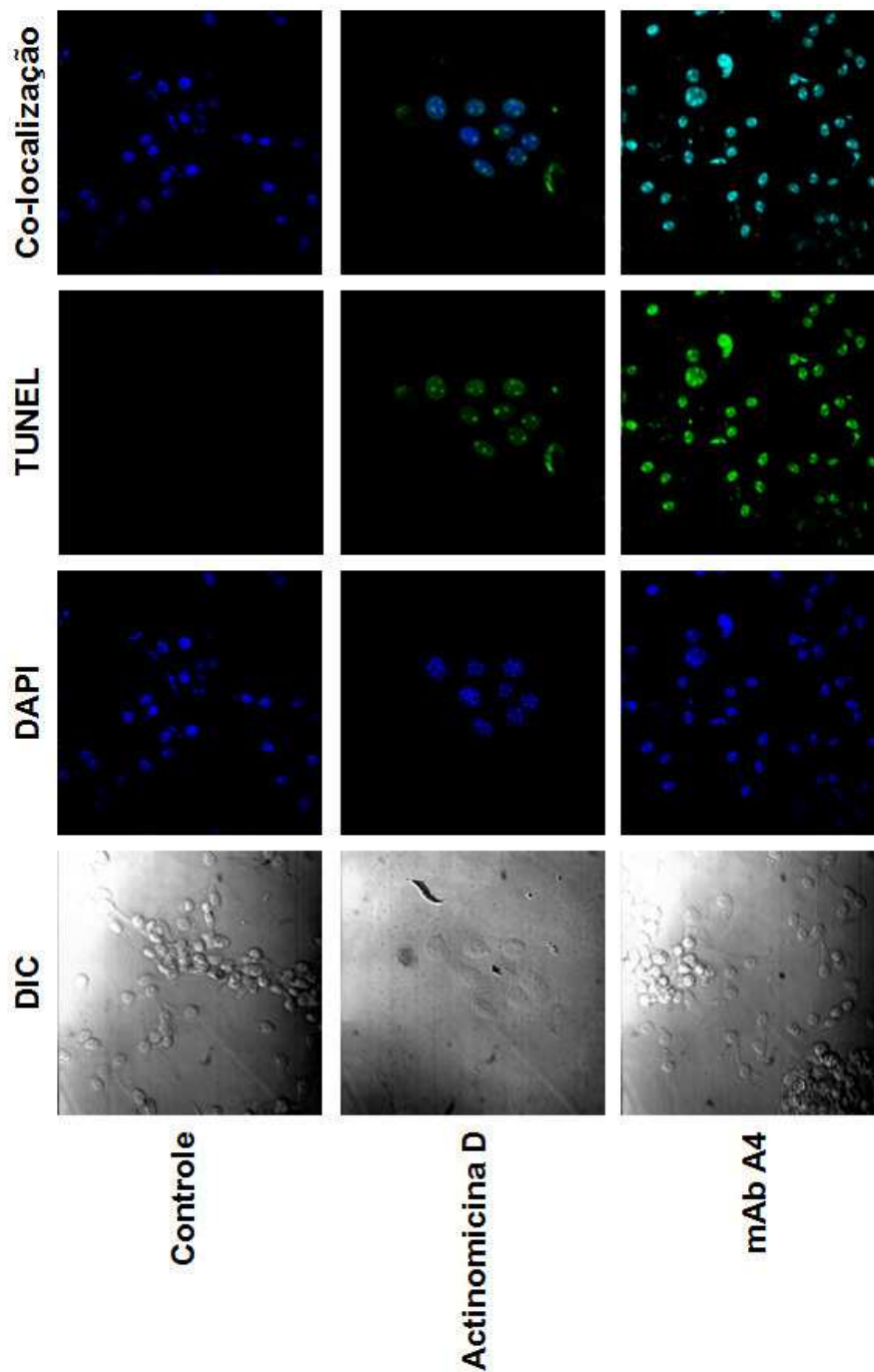


Figura 21. Ensaio de TUNEL para demonstrar a degradação oligonucleossomal na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 após tratamento com mAb A4. Células tumorais foram tratadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Actinomicina D por 2h ou com 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb A4 por 18h. *DAPI*: células incubadas com o corante fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindole (em azul), que se liga ao DNA celular. *TUNEL*: células incubadas com a enzima TdT na presença de nucleotídeos fluorescentes, que identifica o DNA fragmentado em 200 pb (em verde). *Co-localização*: sobreposição das imagens de DAPI e TUNEL. *Aumento*: 830x.

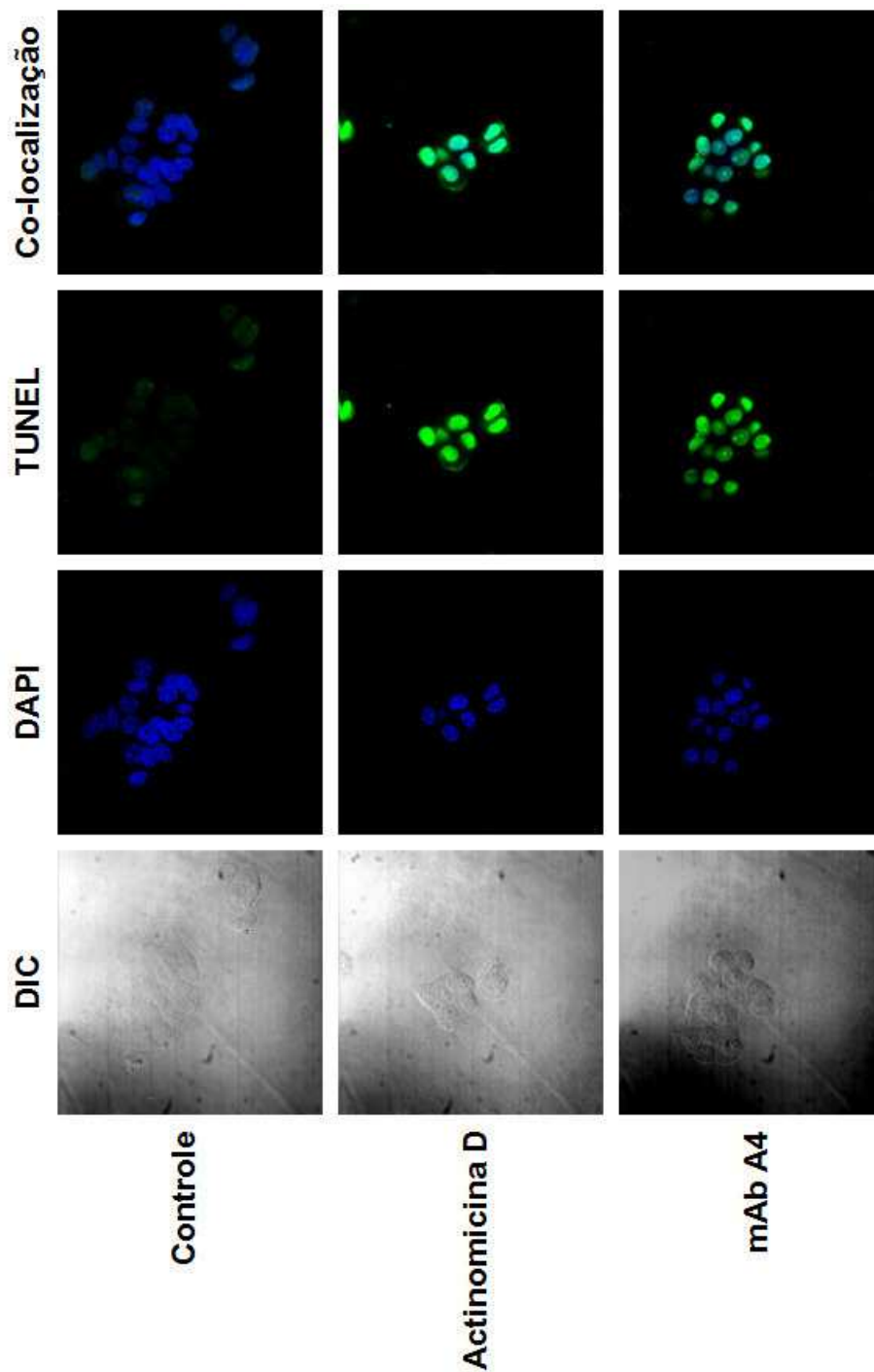


Figura 22. Ensaio de TUNEL para demonstrar a degradação oligonucleossomal na linhagem de melanoma humano A2058 após tratamento com mAb A4. Ensaio realizado como descrito na legenda da Figura 21.

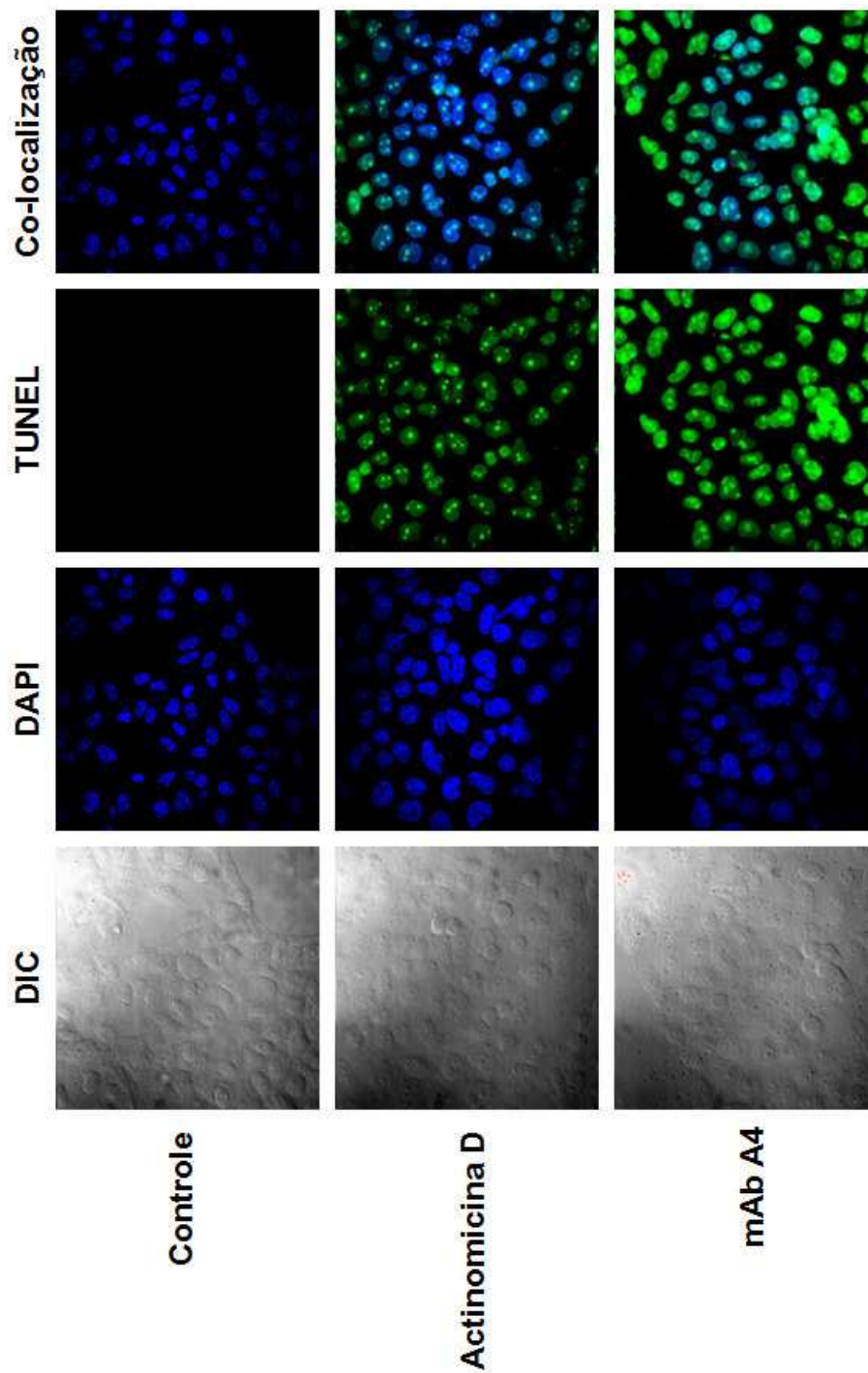


Figura 23. Ensaio de TUNEL para demonstrar a degradação oligonucleossomal na linhagem de carcinoma de cólon humano HCT-8 após tratamento com mAb A4. Ensaio realizado como descrito na legenda da Figura 21.

4.5.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 foram tratadas com 400 µg/mL de mAb A4 por 18h e analisadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão com auxílio da Dr^a Edna F. Haapalainen, Dr^a Rita de Cássia Sinigaglia Galli Coimbra e Márcia Fujie Arajeith Tanakai do Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da UNIFESP.

Nas células não tratadas com o mAb A4, observa-se a integridade da membrana plasmática (PM), a manutenção da morfologia do núcleo (N) e das organelas, tais como mitocôndria (M), retículo endoplasmático (ER), e a presença de melanosomos (Me) (Figura 24 A e B). Nota-se também uma abundância de mitocôndrias nessas células não tratadas.

Após tratamento das células com mAb A4, observa-se alterações na membrana plasmática (PM) (Figuras 25 A e C) e uma redução significativa no tamanho do núcleo (N) (Figuras 25 A e D). Embora ainda sejam encontradas organelas preservadas, como a mitocôndria (M) mostrada na Figura 25B, nota-se que não só a morfologia da maioria das organelas está alterada, como as mitocôndrias arredondadas observadas na Figuras 25 B e C, mas também o número de organelas está diminuído (Figuras 25 A e D). Principalmente, observa-se a presença de numerosas vesículas elétron-densas e vesículas claras no citoplasma das células tratadas. Nas Figuras 25 D e E, observam-se algumas vesículas com conteúdo elétron-denso sugestivo de engolfamento de organelas celulares, que podem ser sugestivas de autofagossomos (V).

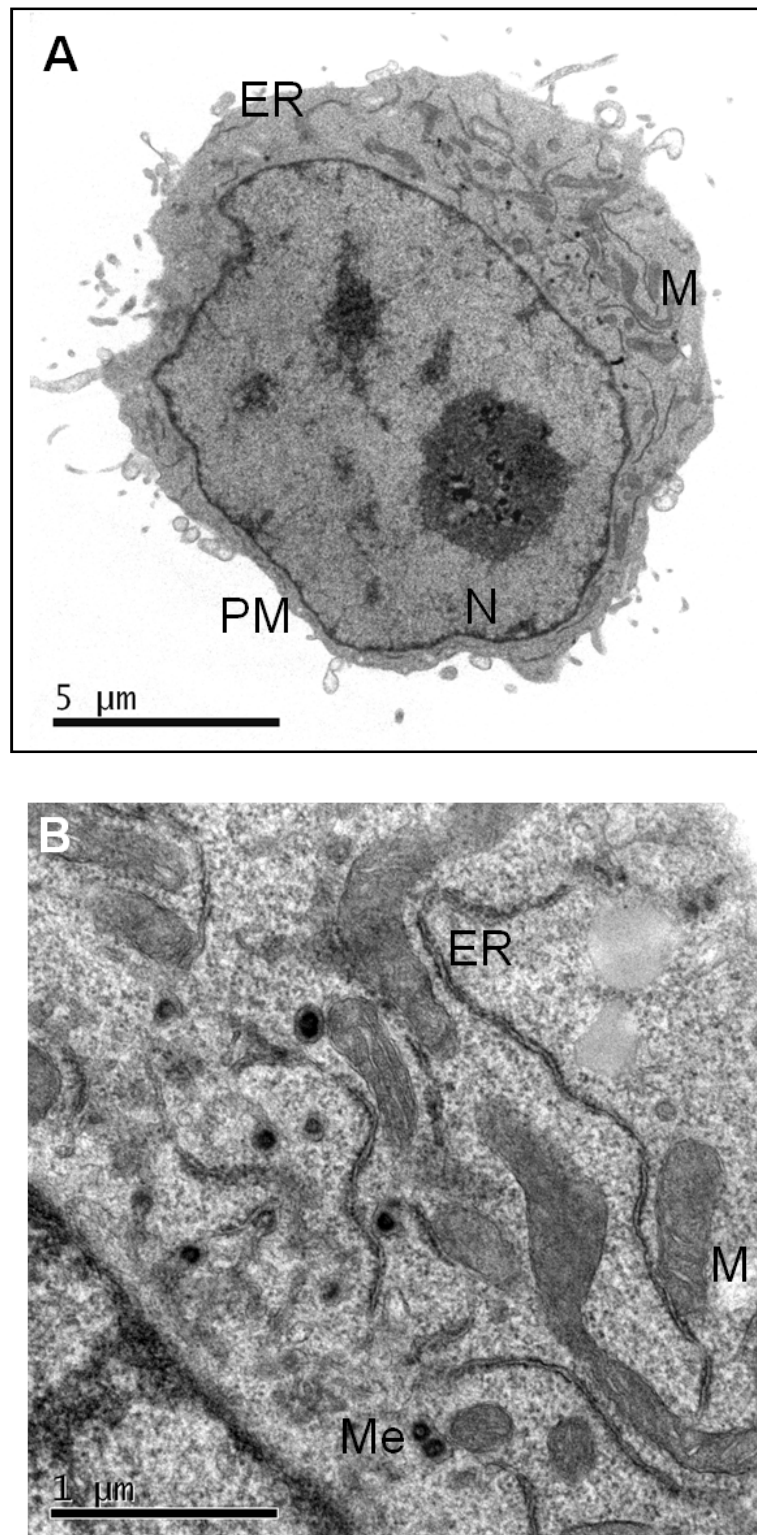
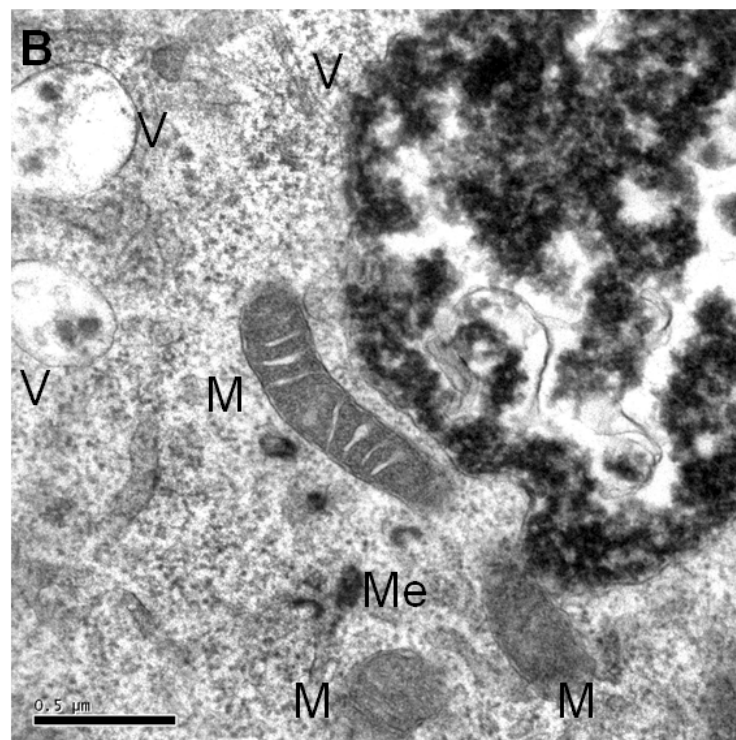
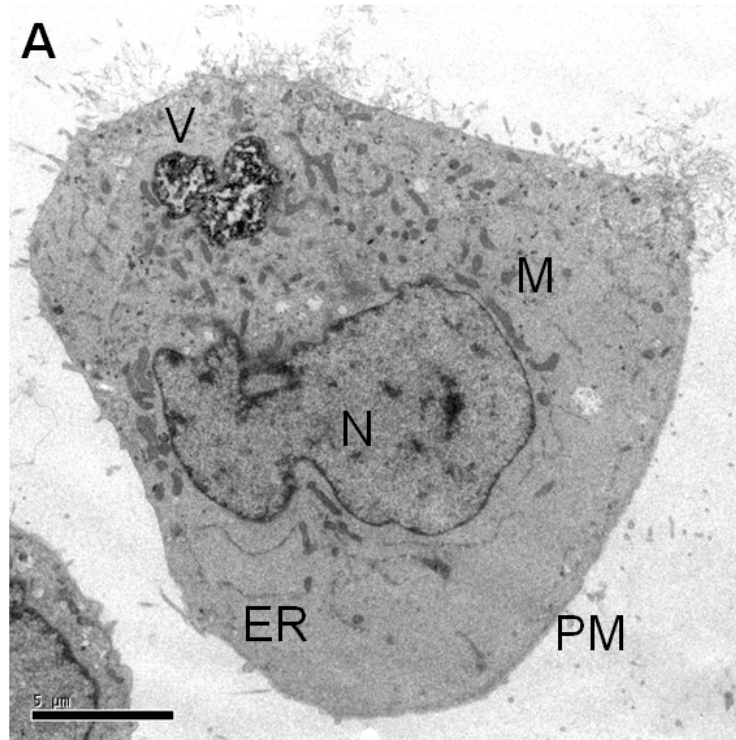
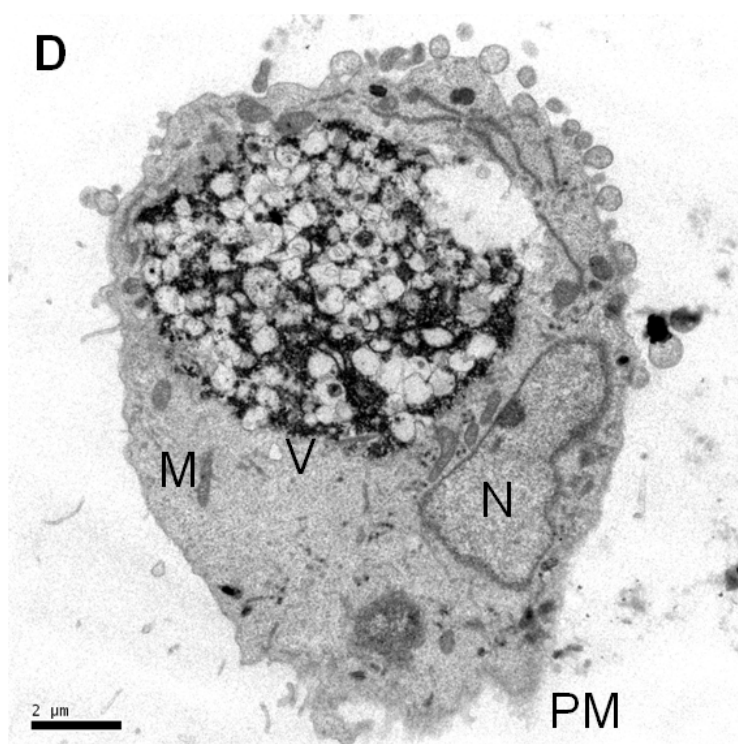
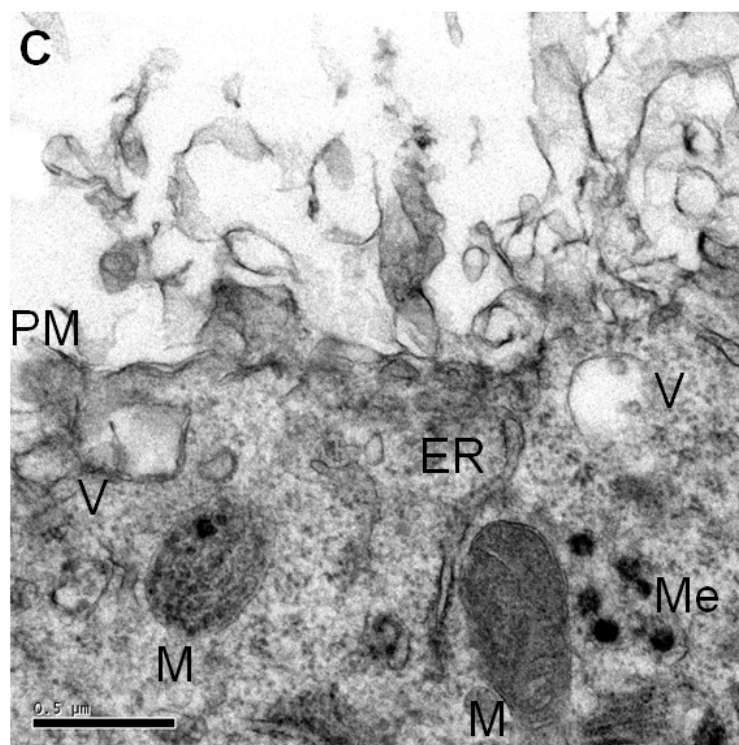


Figura 24. Microscopia eletrônica de transmissão de células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 não tratadas com o mAb A4. (A) Barra de escala, 5 µm. (B) Barra de escala, 1 µm. (PM) membrana plasmática, (N) núcleo, (M) mitocôndria, (ER) retículo endoplasmático e (Me) melanossomos.





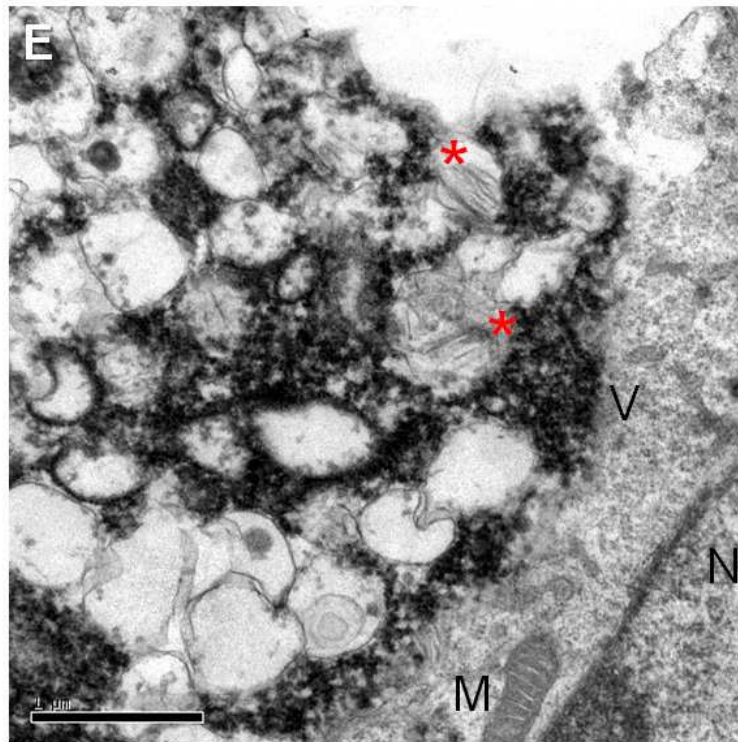


Figura 25. Microscopia eletrônica de transmissão de células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 tratadas por 18 h com o mAb A4. Barras de escala: (A) 5 µm; (B) 0,5 µm; (C) 0,5 µm; (D) 2 µm; e (E) 1 µm. (PM) membrana plasmática, (N) núcleo, (M) mitocôndria, (ER) retículo endoplasmático, (Me) melanossomos e (V) vesículas. Asteriscos vermelhos (*) indicam mitocôndrias internalizadas em vesículas.

4.6. Sinalização intracelular induzida pela interação entre o mAb A4 e a PCDHβ13 na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1

4.6.1. Avaliação por *Immunoblotting*

Já foi demonstrado que a β -catenina pode estar relacionada à sinalização intracelular induzida por protocaderinas. Ose *et. al.* (2009) demonstraram que a superexpressão de PCDH24 em uma linhagem de carcinoma de cólon sequestrou β -catenina para localização submembranar, impedindo sua translocação para o núcleo, o

que inibiu a transcrição de genes ligados ao crescimento característico das células tumorais (sem inibição por contato).

Para verificar se β -catenina poderia estar envolvida na sinalização gerada pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 em células tumorais, células da linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 foram tratadas com 500 μ g/mL de mAb A4 por 10, 30 ou 60 min e, em ensaio de *Immunoblotting*, foram analisados os níveis citosólicos de β -catenina fosforilada (que será degradada em proteassomos e não promoverá a transcrição gênica), de β -catenina total (que migrará para o núcleo e promoverá a transcrição gênica ao interagir com TCF ou FOXO) e do fator de transcrição TCF-4. Como controle constitutivo, foi avaliada a expressão de β -actina.

A diminuição dos níveis de β -catenina fosforilada e de β -catenina total foi tempo dependente, e após 60 minutos observa-se diminuição significativa dos níveis de ambas as formas de β -catenina. Também se observou uma diminuição dos níveis de TCF-4 após 60 min de tratamento (Figura 26). Estes resultados sugerem que a diminuição da sinalização pela via da β -catenina em células de melanoma murino B16F10-Nex2 pode levar à inibição da transcrição de genes-alvo da β -catenina necessários para a sobrevivência e proliferação celular.

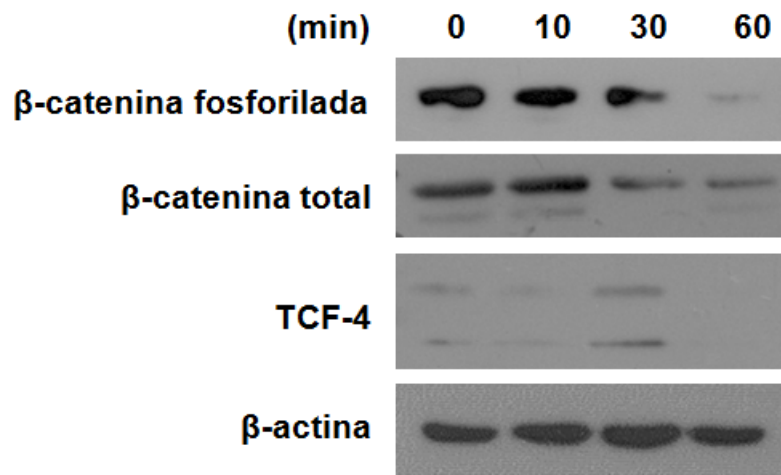


Figura 26. O tratamento com 500 µg/mL de mAb A4 diminui a quantidade de β-catenina e de TCF-4 em células do melanoma murino B16F10-Nex2.1. Células foram tratadas por 10, 30 ou 60 min com o mAb A4. O lisado celular foi analisado em ensaio de *Immunoblotting*. Como controle de expressão protéica constitutiva, utilizou-se β-actina.

4.6.2. Localização celular da β-catenina por Imunofluorescência após incubação com o mAb A4.

A localização da β-catenina está diretamente relacionada às funções que a mesma pode desempenhar na célula. Se a localização é nuclear, a β-catenina está interagindo com TCF ou FOXO e promovendo a transcrição gênica. Se a localização é citoplasmática, a β-catenina não promove a transcrição gênica e pode ser degradada pelos proteassomos. Se a localização é submembranar, a β-catenina está interagindo com moléculas de caderina nas junções aderentes e também não promove a transcrição gênica.

Para verificar a localização celular da β-catenina após tratamento com o mAb A4, células da linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1 e da linhagem de

melanoma humano A2058 foram tratadas com 500 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4 por 30 ou 60 min e a localização da β -catenina foi analisada através de Imunofluorescência Indireta.

Em células não tratadas com o mAb A4 a β -catenina está uniformemente distribuída pelo citoplasma, e sua presença no núcleo não foi detectada, tanto na célula tumoral humana como na murina (Figuras 27 e 28).

Já após 30 min de tratamento com mAb A4 ocorre uma redistribuição celular da β -catenina, com a maioria das células tumorais, humanas e murinas, apresentando uma concentração da molécula na periferia celular, possivelmente em uma localização submembranar (Figuras 27 e 28).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento com o mAb A4 induziu a β -catenina citosólica a se localizar na região submembranar, levando a uma diminuição de β -catenina livre no citosol. Conseqüentemente, ocorre diminuição da migração de β -catenina do citosol para o núcleo celular. Com a ausência de β -catenina nuclear, o fator de transcrição TCF-4 não se liga a região promotora de seus genes-alvos e é degradado, ocorrendo diminuição da transcrição gênica mediada por β -catenina/TCF-4, que é fundamental para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular.

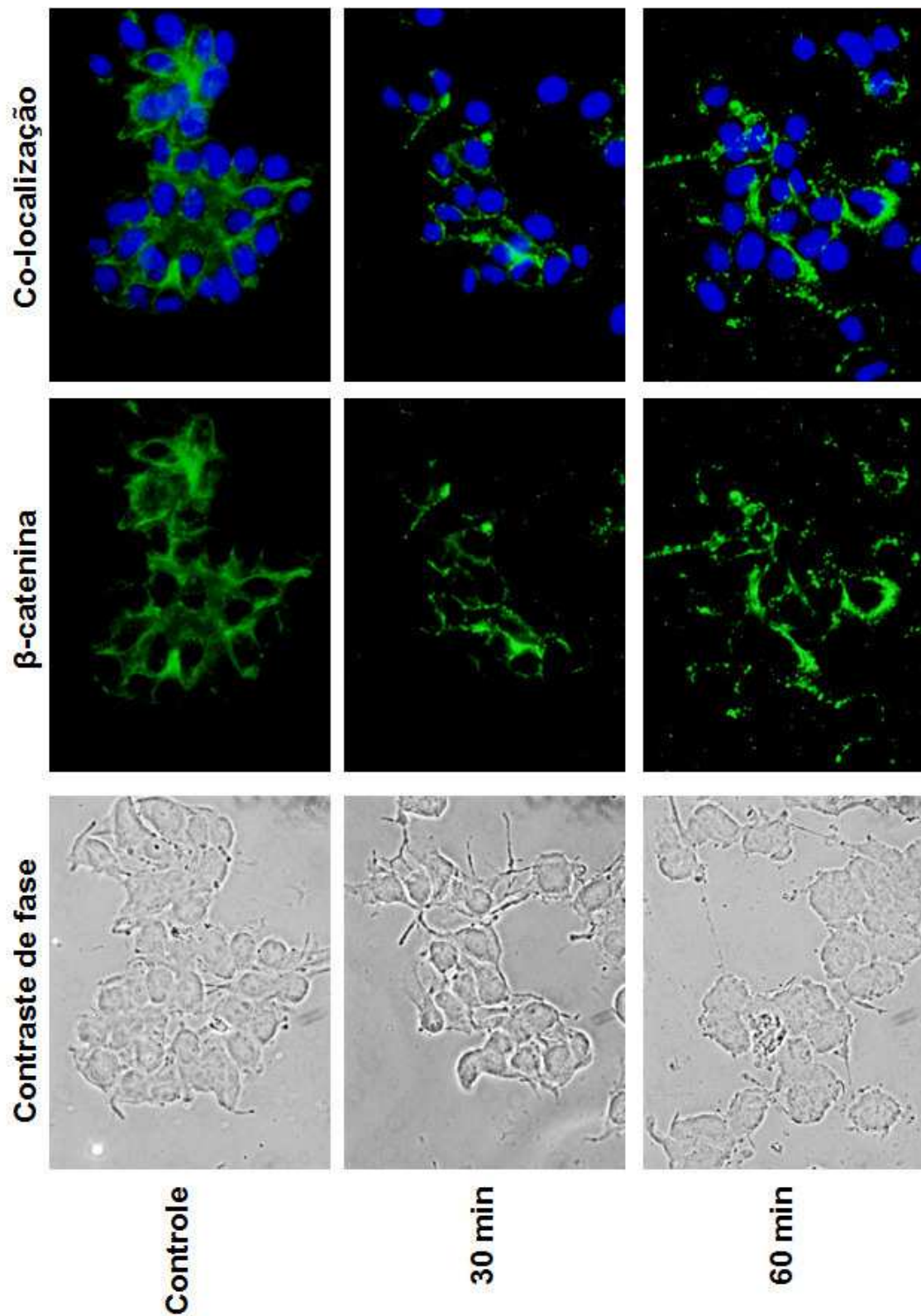


Figura 27. O tratamento com 500 µg/mL de mAb A4 redistribui β-catenina em células do melanoma murino B16F10-Nex2.1. *Controle*, células não tratadas com o mAb A4. *30 e 60 min*, células tratadas com mAb A4 nesses tempos. *Em verde*, anti-β-catenina total; *em azul*, coloração nuclear pelo DAPI.

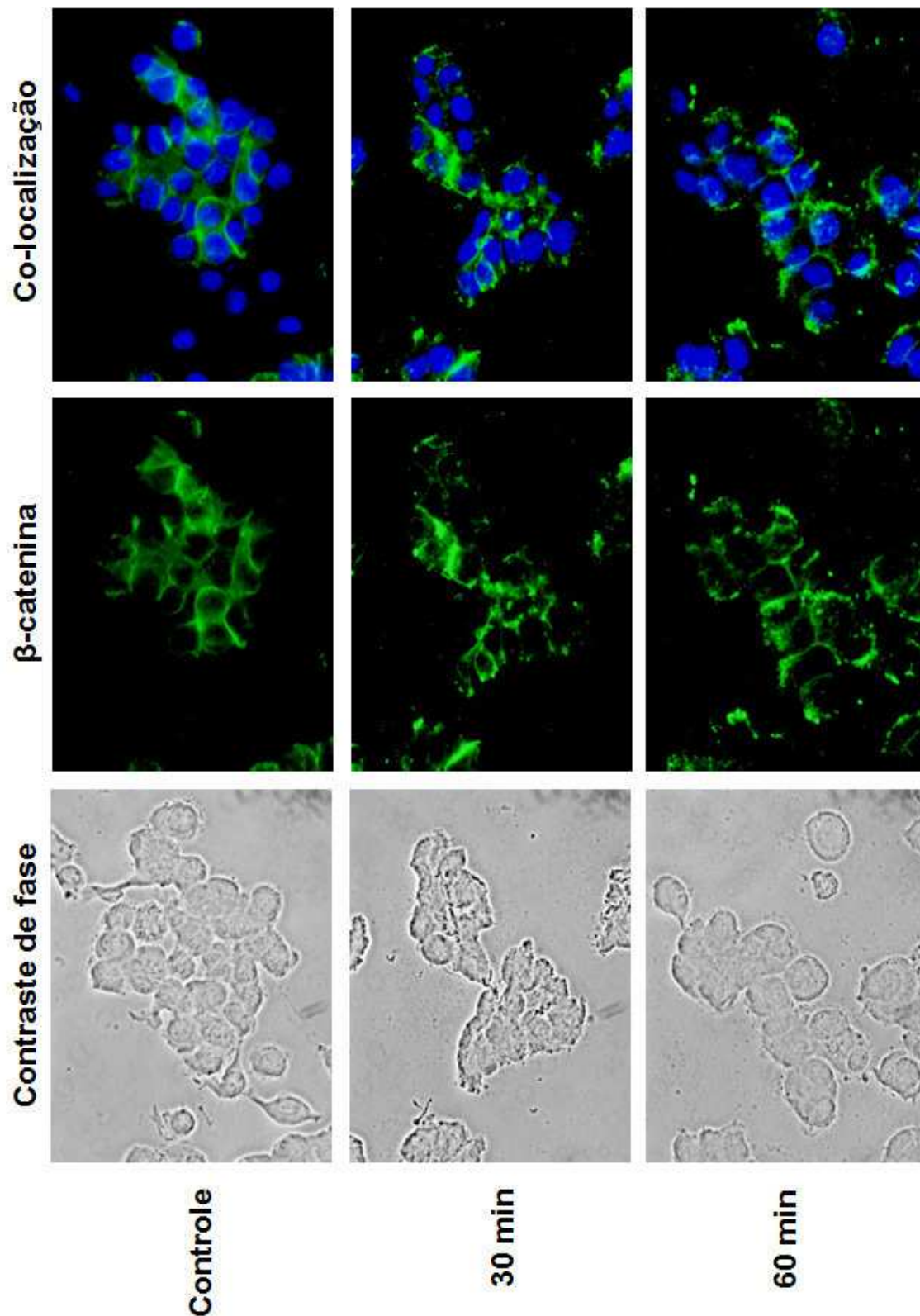


Figura 28. O tratamento com 500 $\mu\text{g/mL}$ de mAb A4 redistribui β -catenina em células do melanoma murino A2058. *Controle*, células não tratadas com o mAb A4. *30 e 60 min*, células tratadas com mAb A4 nesses tempos. *Em verde*, anti- β -catenina total; *em azul*, coloração nuclear pelo DAPI.

5. DISCUSSÃO

O melanoma cutâneo é um tumor maligno originado pela proliferação descontrolada dos melanócitos (Gray-Schopfer *et.al.*, 2007). A incidência do melanoma tem aumentado significativamente nas últimas décadas e se tornado um problema de saúde pública em muitos países (Eberle *et.al.*, 2008). Apesar de corresponder a menos de 5% dos cânceres de pele diagnosticados, o melanoma é responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (Dahl & Guldborg, 2007).

As medidas terapêuticas atualmente aprovadas para o melanoma maligno incluem a remoção cirúrgica do tumor, a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia (Zitvogel *et.al.*, 2008). Entretanto, mesmo com a associação de diversas drogas, o prognóstico de sobrevida média ainda é de poucos meses (Parmiani *et.al.*, 2007). A ineficácia dos tratamentos se deve principalmente à alta resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos e radioterápicos (Simon *et.al.*, 2008).

Na imunoterapia contra o câncer, anticorpos monoclonais (mAbs) são utilizados como ferramentas para diagnóstico, monitoramento e tratamento da doença (Schrama *et.al.*, 2006). Anticorpos utilizados clinicamente são freqüentemente direcionados para vias mitogênicas ou vias que levam à sobrevivência das células. Essas vias estão constitutivamente ativadas ou são diferencialmente superexpressas nas células tumorais comparativamente às células normais. Exemplos bem caracterizados dessas vias incluem membros da família do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), alvos dos anticorpos cetuximab e trastuzumab, que inibem a sinalização pela sua ligação à porção extracelular de Her-1 e Her-2neu, respectivamente (Griggs & Zinkewich-Peotti, 2009). Com o advento da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais, um grande número de mAbs específicos para marcadores associados a tumores têm sido gerado.

Recentemente, novos alvos para anticorpos monoclonais têm sido identificados em células tumorais, e alguns deles induziram processo de morte por apoptose.

Dai e colaboradores (2007) produziram um anticorpo monoclonal quimerizado (mAb cSM5-1) com alta especificidade para carcinoma hepatocelular, melanoma e câncer de mama. O anticorpo cSM5-1 inibe a proliferação celular e induz apoptose parcialmente dependente de caspase-10 em células de carcinoma hepatocelular. Verificou-se que o tratamento com cSM5-1 provocou a condensação da cromatina e do núcleo, a degradação internucleossomal do DNA e a formação de corpos apoptóticos. A atividade anti-tumoral do anticorpo cSM5-1 é correlacionada com a expressão da proteína-alvo, ainda não identificada, na membrana da célula tumoral. Os autores sugerem que a proteína-alvo seja uma proteína de membrana relacionada à sinalização celular que possa induzir apoptose através de receptores de morte e de caspase-10.

O anticorpo monoclonal MX35 foi produzido através da imunização de camundongos com um coquetel de células de carcinoma de ovário humano provenientes de espécimes cirúrgicos. O mAb MX35 está sendo avaliado na fase I de testes clínicos associado ao emissor de partículas alfa *astatine-211*. Yin e colaboradores (2008) demonstraram que o antígeno reconhecido pelo mAb MX35 é uma proteína de transporte localizada na membrana da célula tumoral, conhecida como *sodium-dependent phosphate transport protein 2b* (NaPi2b). O efeito citotóxico do anticorpo MX35 é dependente do nível de expressão de NaPi2b na membrana celular, e os autores sugerem que moléculas de transporte presentes na membrana celular representam uma nova família de alvos imunoterapêuticos potenciais na superfície de células tumorais.

Hu e colaboradores (2009) produziram um anticorpo monoclonal contra a proteína de superfície PIM-1, codificada pelo proto-oncogene PIM-1 (*Provirus integration site for Moloney murine leukemia virus*). PIM-1 está relacionada à

sobrevivência, proliferação, diferenciação, apoptose e tumorigênese. A superexpressão de PIM-1 promove a progressão de tumores de próstata e hematopoiéticos. O tratamento de tumores de próstata murinos e humanos *in vitro* com o anticorpo anti-PIM-1 desfez a interação do complexo PIM-1/Hsp90; reduziu os níveis de PIM-1, Hsp90, AKT fosforilada e Bad fosforilada; e aumentou a ativação da caspase-9, sugerindo a indução da via mitocondrial de morte celular por apoptose. O tratamento com o anticorpo anti-PIM-1 *in vivo* inibiu significativamente o crescimento de tumores de próstata murinos e humanos.

Em nosso laboratório, Dobroff e colaboradores (2002) obtiveram um anticorpo monoclonal (mAb A4) através da imunização de camundongos C57BL/6 com células do melanoma murino B16F10-Nex4. A atividade citotóxica do mAb A4 *in vitro* foi demonstrada contra células de melanoma murino (B16F10-Nex2) e de melanoma humano (SKmel25, SKmel28 e Mel85). A interação do mAb A4 com células de melanoma murino *in vitro* ocasionou a exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática e a degradação internucleossomal do DNA, eventos sugestivos de apoptose. O efeito protetor do mAb A4 contra o melanoma murino também foi verificado *in vivo*, com a redução do desenvolvimento tumoral subcutâneo e pulmonar. Verificou-se que o mAb A4 reconhece uma proteína de superfície celular no melanoma murino B16F10-Nex2, identificada como protocaderina β 13 (PCDH β 13) (Dobroff *et.al.*, 2010 em publicação).

A PCDH β 13 é uma proteína pertencente à superfamília das caderinas, moléculas originalmente descritas como proteínas de adesão celular dependentes de cálcio (Yagi, 2008). A função da PCDH β 13 ainda é desconhecida, mas provavelmente está relacionada à interação intercelular e à sinalização intracelular (Morishita & Yagi, 2007). Junghans e colaboradores (2008) verificaram que a PCDH β 13 é expressa em

altos níveis em múltiplas regiões do Sistema Nervoso Central de camundongos adultos. Entretanto, Dobroff e colaboradores (2010, em publicação) não verificaram neurotoxicidade causada pelo mAb A4 em camundongos C57BL/6 durante os tratamentos do melanoma subcutâneo e metastático, o que pode ser atribuído à inacessibilidade de anticorpos ao Sistema Nervoso Central devido ao papel de transporte seletivo de moléculas exercido pela barreira hematoencefálica.

No presente trabalho, verificamos a expressão do mRNA do gene *Pcdhβ13* por RT-PCR não quantitativo e a expressão da proteína PCDHβ13 por *Immunoblotting* em diversas linhagens tumorais humanas e na linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.1. A expressão da PCDHβ13 foi correlacionada com a reatividade do mAb A4 em ensaio de ELISA-Q e à sensibilidade ao mAb A4 em ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

Embora ainda nem todas as linhagens tumorais utilizadas neste trabalho tenham sido testadas para todos os quatro parâmetros selecionados, em geral observou-se uma correlação direta entre a expressão da proteína PCDHβ13 e a citotoxicidade provocada pelo mAb A4.

Das linhagens testadas, a linhagem de carcinoma mamário humano MCF-7 foi a única que, apesar de expressar o mRNA do gene da *Pcdhβ13*, não apresentou a expressão da proteína PCDHβ13, sendo conseqüentemente insensível à ação citotóxica do mAb A4. Outras duas linhagens de carcinoma mamário humanas (SKBR-3 e MDA) também não foram sensíveis ao mAb A4.

A linhagem de leucemia mielóide aguda humana HL-60 apresentou a menor sensibilidade à ação citotóxica do mAb A4 *in vitro*. O seu valor de IC₅₀ não foi calculado exatamente, mas foi maior que 1000 µg/mL, valor muito superior às demais linhagens analisadas.

Curiosamente, as células de glioblastoma humano U87-MG foram bastante sensíveis ao mAb A4 no ensaio de citotoxicidade, no entanto, apresentaram baixa reatividade no ensaio de ELISA-Q. Uma possível explicação para esse fato seria o procedimento de realização do ensaio de ELISA-Q, que exige a fixação das células com glutaraldeído. A fixação poderia alterar a disposição das moléculas de superfície dessa linhagem tumoral e levar a um impedimento estérico da ligação com o mAb A4 nesse ensaio.

A linhagem de melanócitos murinos imortalizados melan A não expressa o mRNA nem a proteína PCDH β 13, apresenta reatividade residual com o mAb A4 em ELISA-Q, e não é sensível à ação citotóxica do mAb A4.

Os resultados obtidos com as linhagens B16F10-Nex2 e melan A sugerem que o gene *Pcdh β 13* possa atuar como um oncogene no melanoma, todavia, experimentos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese. A realização de ensaio de PCR em tempo real, para a quantificação da expressão gênica de *Pcdh β 13*, pode permitir a correlação entre os níveis de expressão desse gene com a sensibilidade à ação citotóxica do mAb A4 apresentada pelas diferentes linhagens tumorais humanas analisadas.

Nossos resultados também sugerem que a PCDH β 13 possa ser um novo alvo imunoterapêutico em diferentes tipos tumorais, tornando o mAb A4 uma nova e promissora alternativa terapêutica a ser avaliada contra o câncer.

Realizamos em seguida experimentos para identificar como o tratamento com o mAb A4 leva as células tumorais à morte.

A presença do alvo do mAb A4 na superfície das células tumorais murinas e humanas foi confirmada em experimentos de Imunofluorescência Indireta, onde observou-se que o mAb A4 reconheceu tanto a membrana plasmática do melanoma murino B16F10-Nex2.1 como a do melanoma humano A2058 de forma descontínua e

pontuada, sugerindo que a proteína PCDH β 13 se encontra desigualmente distribuída na membrana plasmática.

A interação de um anticorpo com seu alvo celular desencadeia reações diversas. Uma dessas reações pode ser a internalização do complexo alvo-anticorpo. Runnels e colaboradores (2010) demonstraram que anticorpos monoclonais completamente humanizados anti-IGF-1 (*insulin-like growth factor type 1*) bloquearam a proliferação celular *in vitro*, levando à diminuição da quantidade de receptores na superfície da célula por endocitose mediada pelo anticorpo e catabolismo do receptor.

A internalização de um anticorpo com atividade anti-tumoral (mAb BR96) foi também demonstrada por Garrigues e colaboradores (1994). O mAb BR96 reconhece um epítipo do carboidrato Le^y, abundantemente expresso nos carcinomas de cólon, mama, ovário e pulmão. Após 1 minuto de incubação com a célula tumoral, o anticorpo induziu a invaginação da membrana plasmática, foi internalizado em endossomos e direcionado aos lisossomos. Em seguida, ocorreu aumento de volume mitocondrial e perda da integridade da membrana plasmática, eventos característicos de morte celular por necrose.

Em nosso modelo, verificamos que o reconhecimento do melanoma murino B16F10-Nex2.1 pelo mAb A4 ocasionou a internalização do complexo mAb A4/PCDH β 13 em vesículas endocíticas após cerca de 10 min de incubação. Após 1h de incubação com o anticorpo, houve aumento do número de vesículas positivas para a marcação com mAb A4, mas não houve co-localização entre essas vesículas e lisossomos, demonstrando que o anticorpo não é direcionado para degradação intracelular em lisossomos no tempo analisado. Vesículas formadas pela internalização do complexo protéico podem ser também visualizadas nas imagens de microscopia eletrônica das células tumorais tratadas com o mAb A4 (Figura 25).

Experimentos adicionais são necessários para melhor compreender o processo endocítico que ocorre após interação do mAb A4 com seu alvo celular. Primeiro, a natureza das vesículas formadas deve ser determinada, assim como o caminho intracelular seguido por essas vesículas, utilizando-se marcadores específicos das vias endocíticas. Além disso, deve ser determinado se o processo é dependente de energia, caracterizando uma endocitose mediada por receptor, realizando-se ensaios a 37 °C e a 4°C. Também é importante determinar se a ação citotóxica do mAb A4 depende de sua internalização.

Corroborando resultados preliminares que sugeriam que a interação do mAb A4 com células tumorais induzia um processo de morte celular por apoptose, verificamos que o tratamento de células do melanoma murino B16F10-Nex2.1 com o mAb A4 por 18h induziu a exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática, a ativação das caspases-9, -3 e -6, a condensação da cromatina e a degradação internucleossomal do DNA. Esses eventos são característicos de um processo apoptótico (Kroemer *et.al.*, 2009).

A ativação da caspase-9 sugeriu a participação da mitocôndria no processo de morte causado pelo mAb A4. A caspase-9 tem um papel central na via intrínseca ou mitocondrial de apoptose, e essa enzima é ativada em um complexo multimérico denominado apoptossomo, formado pelas proteínas Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) e citocromo c (Allan & Clarke, 2009). O citocromo c é liberado pela mitocôndria após a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP), considerado como um ponto irreversível na cascata de eventos da via intrínseca da apoptose. A MMP induz conseqüências catastróficas na célula, que são a dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que imediatamente bloqueia a síntese de ATP e outras vias biossintéticas, e a translocação de proteínas confinadas na membrana interna da

mitocôndria, como citocromo c, Smac/Diablo, AIF, endonuclease G, dentre outras. (Galluzzi *et. al.*, 2010). Depois de ativada, a caspase-9 ativa as caspases efetoras -3 e -7, levando a célula aos passos finais do processo de apoptose (Allan & Clarke, 2009). A permeabilização da membrana mitocondrial pode ser provocada pelo acúmulo de cálcio, pela diminuição do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), mas também pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que ocorre como resultado do aumento do cálcio citoplasmático e o acúmulo do cálcio mitocondrial (Rosenstock *et. al.*, 2004).

Corroborando a participação da mitocôndria no processo de morte induzido pelo mAb A4, observamos um aumento significativo na produção de superóxido após 3h de incubação com as células B16F10-Nex2. Ânions superóxido podem amplificar ainda mais um estímulo apoptótico gerado, levando à formação de poros na mitocôndria e à liberação de proteínas que regulam positivamente a apoptose. A interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 levou as células à morte por apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial.

A transdução de sinais pelas proteínas Wnt/ β -catenina é uma via de sinalização altamente conservada que está relacionada à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. A proteína β -catenina está envolvida em múltiplos processos celulares, incluindo manutenção dos complexos de adesão celular, regulação da endocitose de caderinas e regulação da transcrição gênica mediada por TCF/LEF (Klaus & Birchmeier, 2008; Delva & Kowalczyk, 2009).

β -catenina tem também papel importante na internalização de N-caderina e no tráfego intracelular da E-caderina, modulando a disponibilidade dessas moléculas na superfície celular (Delva & Kowalczyk, 2009). Como outros receptores celulares, as caderinas clássicas e não-clássicas, pertencentes à mesma superfamília a que também

pertencem as protocaderinas, podem ser internalizadas por diferentes vias endocíticas para modular a capacidade adesiva da superfície celular. A endocitose de moléculas de caderina, quando cálcio é depletado, pode ser mediada por clatrina, por caveolina, por *lipid rafts* ou por macropinocitose (Ivanov *et.al.*, 2004). As condições que determinam a via escolhida para internalização ainda são pouco conhecidas, mas parecem depender do ambiente celular. A regulação da endocitose das caderinas é exercida principalmente pelas proteínas p120-catenina e β -catenina, que atuam como adaptadoras para a ligação com o citoesqueleto e como recrutadoras de moléculas que regulam a função das caderinas. A β -catenina está presente na membrana plasmática em células migratórias e é necessária para a macropinocitose de N-caderina através de um mecanismo que envolve Rac, Cdc42 e IQGAP1. Similarmente, a ativação de Rac ocasiona a internalização do complexo E-caderina/ β -catenina através de caveolina-1 em queratinócitos. Após a endocitose, as moléculas de caderinas podem ser degradadas em lisossomos ou recicladas para a membrana plasmática (Delva & Kowalczyk, 2009).

A participação de β -catenina em diversos modelos tumorais já foi demonstrada. A inibição da via β -catenina em diferentes tumores, tais como carcinoma de cólon, de próstata e de mama, foi relacionada à inibição da progressão tumoral e à indução de apoptose (Fang *et.al.*, 2009; Murillo *et.al.*, 2009; Palozza *et.al.*, 2008).

Entretanto, o papel exato dessa via de sinalização no melanoma permanece controverso, e parece ser influenciado pela localização tumoral. Takahashi e colaboradores (2006) demonstraram que o silenciamento do mRNA da β -catenina em células do melanoma murino B16-BL6 ocasionou a diminuição da viabilidade celular, a indução da apoptose e a diminuição da progressão do tumor subcutâneo *in vivo*, mimetizando o crescimento do tumor primário. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que o silenciamento do mRNA da β -catenina ocasionou o rearranjo dos

complexos de adesão na superfície da célula tumoral, promovendo maior motilidade celular e aumentando a formação de metástases pulmonares, sendo a inibição da via β -catenina nesse modelo metastático associada à progressão tumoral (Takahashi *et.al.*, 2008).

Corroborando os achados anteriores em que a inibição da via de β -catenina está implicada na progressão tumoral, Bellei e colaboradores (2008) demonstraram que a inibição de GSK3 β , molécula que constitui o complexo de degradação de β -catenina, em células do melanoma murino B16F10, ocasionou o aumento dos níveis de β -catenina nuclear e o aumento da transcrição de genes de diferenciação melanocítica promovida por TCF/LEF. A ativação da via β -catenina levou à diminuição da viabilidade celular e à promoção da melanogênese.

Chien e colaboradores (2009) também demonstraram que a presença de β -catenina nuclear no melanoma humano é positivamente correlacionada com a diminuição da proliferação tumoral e com a maior sobrevida dos pacientes. Esses resultados foram observados também *in vitro*, em células de melanoma murino B16F1 e em células de melanoma humano (UACC1273, GDS1375, GDS1989 e Mel375), nas quais a superexpressão de WNT3A, um ativador da via β -catenina, ocasionou a diminuição da proliferação celular, a diminuição do número de células na fase S do ciclo celular, o aumento da transcrição de genes relacionados à diferenciação dos melanócitos e à diminuição do volume tumoral *in vivo*. Não foram observadas diferenças no número de células apoptóticas.

Demonstrando um papel importante da via Wnt/ β -catenina na transformação de melanócitos em melanoma, Delmas e colaboradores (2007) mostraram que, a superexpressão de uma forma mutante de β -catenina constitutivamente ativa em melanócitos murinos, imortalizou essas células pelo silenciamento do promotor p16

(Ink4a), não ocasionando o aumento da proliferação e nem a diferenciação para melanoma em um período de dois anos. Somente com a presença simultânea de β -catenina e N-Ras constitutivamente ativadas ocorreu a transformação desses melanócitos imortalizados para células tumorais. Esse resultado sugere que o papel da via β -catenina no melanoma é influenciado pela regulação exercida por outras vias de sinalização intracelular, nesse caso a via MAPK.

Em nosso modelo, verificou-se que o tratamento das células de melanoma murino B16F10-Nex2.1 com o mAb A4 ocasionou a diminuição dos níveis de β -catenina fosforilada e total após 30 min, com total depleção de β -catenina fosforilada após 60 min de tratamento. A diminuição dos níveis de β -catenina fosforilada corrobora a diminuição dos níveis de β -catenina total no citoplasma. Observou-se também uma inibição total da expressão de TCF-4 após 60 min de incubação com o mAb A4. Adicionalmente, observamos que o tratamento dessas células com mAb A4 por 30 ou 60 min ocasionou o redirecionamento da β -catenina do citosol para a periferia celular, possivelmente para a região submembranar. A intensidade de fluorescência observada na região submembranar foi positivamente correlacionada com o tempo de incubação com o anticorpo. Similarmente ao que ocorre para a interação entre N-/E-caderina e β -catenina (Delva & Kowalczyk, 2009), a presença de β -catenina na região submembranar pode sugerir que a mesma esteja associada à proteína PCDH β 13 e que contribua para a endocitose do complexo mAb A4/PCDH β 13. A PCDH β 13 não apresenta na sua cauda citoplasmática um sítio de ligação à β -catenina, todavia, a participação de moléculas da superfamília das caderinas formando um agregado com a molécula de protocaderina não está descartada, sendo então a caderina a possível responsável pela ligação à β -catenina. Foram tentativamente utilizados anticorpos comercialmente adquiridos contra E- e N-caderinas murinas (Cell Signaling) para a co-localização na membrana dessas moléculas

e da PCDH β 13. No entanto, em ensaios de *Immunoblotting* e de Imunofluorescência Indireta, esses anticorpos não apresentaram um padrão de reconhecimento esperado, o que não nos permitiu responder à nossa pergunta.

O redirecionamento da β -catenina para a região submembranar foi também observado após a superexpressão da PCDH24 em células de carcinoma de cólon humano HCT-116 (Ose *et.al.*, 2009), e após o tratamento de células de carcinoma de cólon humano CaCo2 com o antiinflamatório ácido 5-aminosalicílico (Parenti *et.al.*, 2009), em ambos também sendo correlacionada à uma diminuição na sinalização pela β -catenina.

Desta forma, nossos resultados sugerem que a via de sinalização de β -catenina foi inibida pelo mAb A4 em células de melanoma murino B16F10-Nex2. O reconhecimento da PCDH β 13 pelo mAb A4 promove o deslocamento da β -catenina citosólica para a região submembranar, ocasionando a redução dos níveis de β -catenina livre (fosforilada e total) no citosol. Conseqüentemente, a translocação de β -catenina para o núcleo é diminuída e a transcrição gênica mediada por TCF-4 é impedida, levando à morte celular.

Um dos genes-alvo do fator de transcrição TCF que poderia ser inibido pelo tratamento com o mAb A4 é o gene codificador da proteína *survivin*, um membro da família de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). A proteína *survivin* é uma reguladora-chave entre a mitose e a apoptose. Inicialmente, a proteína *survivin* foi descrita como um inibidor direto da caspase-9, conseqüentemente, promovendo a sobrevivência celular. A inibição da proteína *survivin* é realizada pela proteína SMAC/DIABLO, liberada pela mitocôndria, quando há indução de apoptose pela via intrínseca. Com a inibição de *survivin*, a caspase-9 fica disponível para a formação do apoptossomo com conseqüente ativação da cascata de caspases que leva à morte celular.

Esse mecanismo é utilizado pelo Herceptin®, um mAb anti-ErbB2, receptor superexpresso em células de carcinoma de mama, utilizado já na clínica para tratamento desse tipo de câncer (Zhu *et.al*, 2010). Recentemente, foram também descritos os papéis da proteína *survivin* na regulação da checagem do fuso mitótico, na promoção da angiogênese e na promoção da quimiorresistência (Mita *et.al.*, 2008). Torres e colaboradores (2007) relataram que o seqüestro de β -catenina por E-caderina em domínios caveolares na membrana plasmática ocasionou a redução da expressão de *survivin* e a indução de apoptose em tumores epiteliais.

Nas imagens de microscopia eletrônica das células B16F10-Nex2 tratadas com o mAb A4, curiosamente, foram observadas algumas vesículas contendo o que parecem ser organelas elétron-densas no seu interior (Figura 25). Essas vesículas sugerem que um processo autofágico tenha sido também estimulado pela interação entre o mAb A4 e a PCDH β 13 nas células de melanoma.

A autofagia, identificada originalmente em leveduras, é um processo conservado evolutivamente onde células digerem seu próprio conteúdo citoplasmático. Em células eucarióticas esse processo é crítico na manutenção da homeostasia, uma vez que está envolvido na degradação de proteínas de longa vida, no *turnover* de organelas, e em situações de estresse, como na falta de nutrientes, sendo responsável pela reciclagem da energia para manutenção celular. A autofagia é um processo fortemente regulado por um número limitado de genes altamente conservados denominados *Reguladores da Autofagia*, ou ATG. Além de regularem processos fisiológicos importantes, esses genes também estão envolvidos na regulação de processos patológicos, como o câncer. A autofagia é induzida em resposta a múltiplos estresses durante a progressão do câncer, incluindo privação de nutrientes, hipóxia e pelo estresse do retículo endoplasmático (resposta a proteínas mal-formadas e/ou agregadas). Todavia, é também observada

durante o tratamento com diversos agentes quimioterápicos, o que sugere que a autofagia seja uma via de sobrevivência em resposta a estímulos deletérios à célula (Chen & Debnath, 2010; Wilsinson & Ryan, 2010).

Apesar dos efeitos de pró-sobrevivência da autofagia levarem à resistência aos quimioterápicos, com frequência esses efeitos são contrabalanceados por efeitos supressores de tumor, levando à célula à morte. Existem algumas hipóteses para explicar esses dois eventos paradoxais: (1) em células resistentes à apoptose, a autofagia pode prevenir a morte dessas por necrose, o que levaria a uma inflamação local exacerbada; (2) a autofagia previne a instabilidade genômica; e (3) autofagia durante o estresse metabólico (e alta densidade celular) previne o crescimento celular (Mizushima *et.al.*, 2008; Chen & Debnath, 2010; Wilsinson & Ryan, 2010).

Na autofagia, porções do citoplasma são englobadas em uma vesícula denominada autofagossomo, que em seguida se funde com o lisossomo para formar um autolisossomo, onde o material interno é degradado (Wilsinson & Ryan, 2010). O método mais tradicional de visualização de um processo autofágico é a visualização em microscopia eletrônica dos autofagossomos, vesículas com dupla membrana contendo no seu interior material citoplasmático não digerido, principalmente mitocôndrias e pedaços do retículo endoplasmático, previamente à sua fusão com o lisossomo. Mas para a completa identificação do autofagossomo, é necessária a utilização do marcador LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*). Inibidores para essa via também são disponíveis, embora não específicos (Mizushima *et.al.*, 2008).

No presente trabalho, observamos a presença de vesículas sugestivas de autofagossomos no citoplasma de células B16F10-Nex2 tratadas com o mAb A4, por conterem em seu interior estruturas elétron-densas que se assemelham a organelas celulares. Embora essas vesículas ainda não tenham sido identificadas seguramente

como autofagossomos com o marcador LC3, podemos especular que a autofagia poderia funcionar como um fator pró-sobrevivência em nosso sistema, eliminando as mitocôndrias afetadas pelo tratamento com o mAb A4. Por outro lado, a ativação exagerada de autofagia poderia ativar mecanismos apoptóticos (Mizushima *et.al.*, 2008) e contribuir para o processo citotóxico induzido pelo mAb A4. A indução simultânea de apoptose, autofagia e necrose por mAbs específicos para o receptor de transferrina de galinha já foi previamente descrita (Ohno *et.al.*, 2008). E também já foi demonstrado que para diversos quimioterápicos e mAbs utilizados na clínica, a via autofágica é importante no mecanismo de ação, uma vez que sua inibição reduziu a citotoxicidade do tratamento (Chen & Debnath, 2010; Mizushima *et.al.*, 2008).

Finalmente, com base nos resultados obtidos nesse trabalho, propomos um mecanismo de ação citotóxica que integra a internalização do complexo mAb A4/PCDH β 13, a inibição da sinalização intracelular por β -catenina e TCF-4, a indução de apoptose pela via mitocondrial e uma possível indução de autofagia (Figura 29).

Primeiramente, o mAb A4 reconhece a molécula PCDH β 13 na membrana plasmática e é rapidamente endocitado (em cerca de 10 min), como visualizado em microscopia confocal e de transmissão eletrônica. Não sabemos ainda se a endocitose é necessária ou não para o efeito citotóxico do mAb.

A interação do mAb A4 com a PCDH β 13 na membrana plasmática induz a redistribuição da β -catenina do citosol para uma região submembranar (em 30 min), como visualizado em microscopia de fluorescência. Conseqüentemente, ocorre a diminuição dos níveis de β -catenina livre (em 30 min), visualizada no ensaio de *Immunoblotting*. Presumimos que para que esse evento ocorra, é necessária a agregação de outras moléculas responsáveis pela sinalização, como por exemplo, moléculas da superfamília das caderinas.

Como consequência, ocorre diminuição da translocação de β -catenina para o núcleo e também dos níveis totais de TCF-4 (em 60 min), como observado no ensaio de *Immunoblotting*, levando à diminuição da transcrição de diversos genes induzidos pela via β -catenina/TCF-4. Estímulos de sobrevivência podem deixar de ser expressos, levando à ativação da via mitocondrial de apoptose, com formação de poros na mitocôndria, permitindo a liberação de proteínas que normalmente ficam restritas à membrana interna da mitocôndria, ocasionando então a formação do apoptossomo que é responsável pela ativação das caspases -9, 3 e 6. A participação da mitocôndria no processo de morte induzida pelo mAb A4 foi corroborada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mais especificamente, superóxido (a partir de 3h), que pode exacerbar um efeito apoptótico já previamente induzido. Os eventos terminais da apoptose foram então ativados, ocorrendo a exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática, condensação da cromatina e degradação internucleossomal do DNA, levando a célula à morte, como observado nos ensaios de citometria de fluxo, coloração nuclear com o corante Hoescht 33358, formação de DNA *ladder* e ensaio de TUNEL.

A possível presença de vesículas autofágicas pode ter sido induzida pela excessiva quantidade de mitocôndrias permeabilizadas após o tratamento com o mAb A4, ou ainda por estímulos provocados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por essa organela que afetariam outras moléculas da célula, como DNA, lipídeos e proteínas. Não está claro se a autofagia estaria funcionando como um estímulo pró- ou anti-sobrevivência em nosso modelo de apoptose induzida pelo mAb A4.

Nossos resultados demonstram que o mAb A4 é um potencial agente anticancerígeno com atividade contra diversos tipos tumorais, e que a proteína

PCDH β 13 é um potencial marcador de malignidade em melanoma. O mecanismo de morte por apoptose pela via intrínseca induzido pelo mAb A4 foi comprovado tanto em células tumorais murinas como humanas, e o envolvimento da via de sinalização de β -catenina/TCF-4 foi sugerido, assim como uma possível participação da via autofágica no processo.

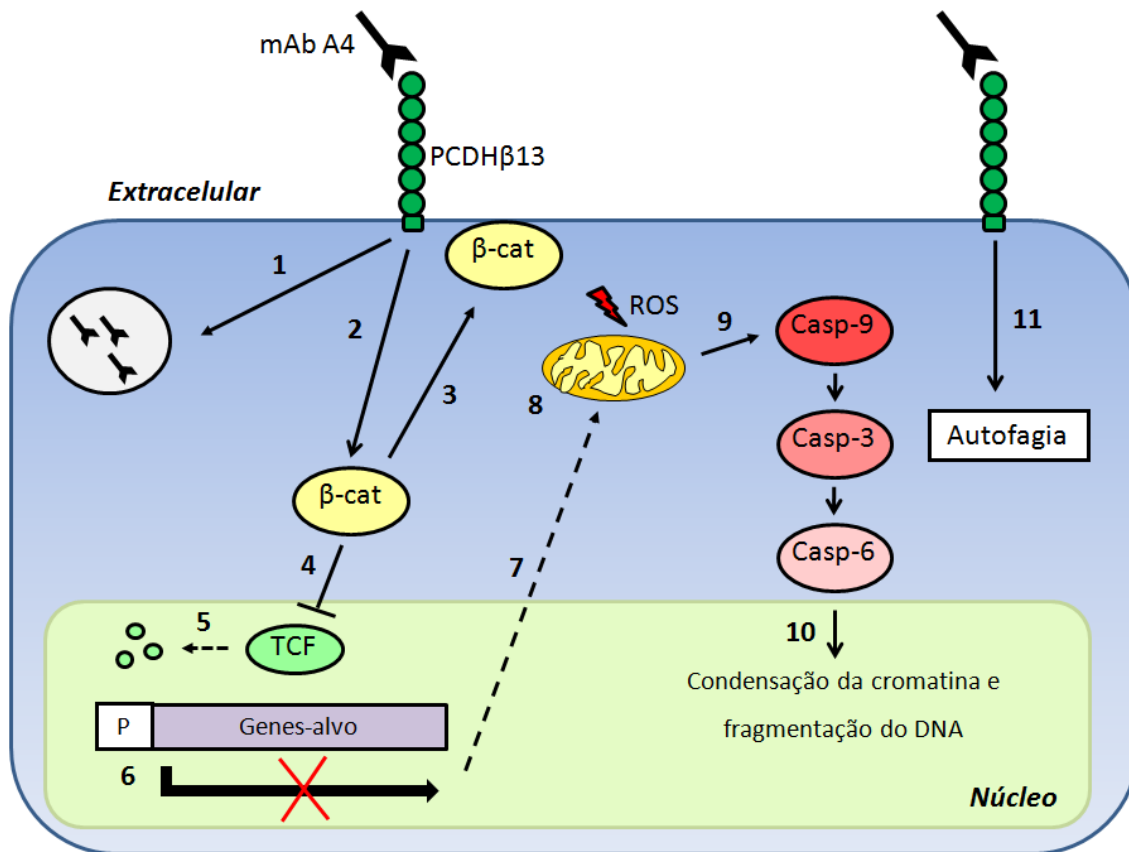


Figura 29. Mecanismo de citotoxicidade proposto para a interação entre o mAb A4 e a proteína transmembrana PCDH β 13. (1) o mAb A4 reconhece a região extracelular da PCDH β 13 e é internalizado em vesículas endocíticas; (2) O mAb A4 inibe a via de sinalização intracelular β -catenina através (3) da redistribuição da β -catenina para a periferia celular, possivelmente para uma região submembrana; (4) Com a diminuição dos níveis de β -catenina livre no citosol, não ocorre migração da β -catenina para o núcleo celular, e consequentemente, (5) ocorre diminuição dos níveis de TCF-4 e degradação do mesmo; (6) TCF-4 não se liga aos promotores de seus genes-alvos e não promove a transcrição gênica. (7) A diminuição da produção de proteínas anti-apoptóticas colabora para a indução da via mitocondrial de apoptose (8), com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e (9) ativação das caspases efetoras -3 e -6; (10) A indução das caspases ocasiona condensação da cromatina e a degradação internucleossomal do DNA, levando a célula tumoral à morte; (11) Os danos celulares causados pelo mAb A4 também ocasionam a ativação da autofagia. Ainda não é conhecido se a autofagia atua como um mecanismo pró- ou anti-sobrevivência após o tratamento da célula tumoral com o mAb A4.

6. CONCLUSÕES

1. O mAb A4, um anticorpo monoclonal desenvolvido em camundongos contra células de melanoma murino B16F10, reconhece a proteína PCDH β 13 na superfície de células tumorais murinas e humanas.
2. Somente as linhagens que expressam a PCDH β 13 na membrana plasmática são susceptíveis à ação citotóxica do mAb A4. Dentre as mesmas, encontram-se células de diversos tumores humanos, como melanoma, carcinoma de cólon, carcinoma de cérvix uterino e glioblastoma.
3. O reconhecimento da proteína PCDH β 13 pelo mAb A4 induz a internalização do complexo em vesículas endocíticas não-lisossomais.
4. O mAb A4 induz a redistribuição da proteína de sinalização intracelular β -catenina do citosol para a região submembranar, ocasionando a diminuição dos níveis de β -catenina livre no citosol e do fator de transcrição TCF-4.
5. A inibição da via de sinalização β -catenina provavelmente ocasiona a diminuição da transcrição de genes relacionados à sobrevivência e proliferação celular. Conseqüentemente, ocorre indução de apoptose através da via mitocondrial.
6. As alterações provocadas pelo mAb A4 possivelmente induzem uma via autofágica em paralelo à via apoptótica induzida.
7. O mAb A4 é um potencial agente anti-tumoral com atividade contra distintos tipos tumorais. A proteína PCDH β 13 é um potencial marcador de malignidade em melanoma.

7. PERSPECTIVAS

7.1. Caracterização mais detalhada das vias de sinalização intracelular envolvidas no mecanismo de morte celular desencadeado pela interação entre o mAb A4 e a proteína PCDH β 13 em células de melanoma murino B16F10-Nex2.1.

7.2. Determinação da importância funcional da proteína PCDH β 13 no desenvolvimento e progressão tumorais através de seu silenciamento em células de melanoma murino B16F10-Nex2.1.

7.3. Avaliação do uso dos peptídeos derivados de CDR do mAb A4 na terapia anti-tumoral no modelo de melanoma murino B16F10-Nex2.1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2003) *Imunologia Celular e Molecular*. Ed. Revinter, 4ª ed. Cap. 17, Imunidade aos Tumores.
- Allan, L.A., Clarke, P.R. (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J*, 276 (21): 6063-6073.
- Bachmann, I.M., Straume, O., Puntervoll, H.E., Kalvenes, M.B., Akslen, L.A. (2005) Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*, 11: 8606–8614.
- Bellei, B., Flori, E., Izzo, E., Maresca, V., Picardo, M. (2008) GSK3 β inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes. *Cellular Signaling*, 20: 1750-1761.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Burgering, B.M. (2008) A brief introduction to FOXology. *Oncogene*, 27: 2258-2262.
- Calnan, D.R., Brunet, A. (2008) The FoxO code. *Oncogene*, 27: 2276-2288.
- Chen, N., Debnath, J. (2010) Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Letters*, 584: 1427-1435.
- Chiarella, P., Fazio, V.M. (2008) Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production. *Biotechnol Lett*, 30: 1303-1310.
- Chien, A.J., Moore, E.C., Lonsdorf, A.S., Kulikauskas, R.M., Rothberg, B.G., Berger, A.J., Major, B.M., Hwang, S.T., Rimm, D.L., Moon, R.T. (2009) Activated Wnt/ β -catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *PNAS*, 106 (4): 1193-1198.
- Chin, L., Garraway, L.A., Fisher, D.E. (2007) Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & Development*, 20: 2149-2182.
- Chudnovski, Y., Khavari, P.A., Adams, A.E. (2005) Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*, 115 (4): 813-824.
- Croce, C.M. (2008) Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 358: 502-511.
- Dahl, C., Guldberg, P. (2007) The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS*, 115: 1161-1176.
- Dai, J., Jin, J., Li, B., Wang, H., Hou, S., Qian, W., Kou, G., Zhang, D., Li, J., Tan, M., Ma, J., Guo, Y. (2007) A chimeric SM5-1 antibody inhibits hepatocellular carcinoma cell growth and induces caspase-dependent apoptosis. *Cancer Letters*, 258: 208-214.

- Dallosso, A.R., Hancock, A.L., Szemes, M., Moorwood, K., Chilukamarri, L., Tsai, H-H., Sarkar, A., Barasch, J., Vuononvirta, R., Jones, C., Pritchard-Jones, K., Royer-Pokora, B., Lee, S.B., Owen, C., Malik, S., Feng, Y., Frank, M., Ward, A., Brown, K. W., Malik, K. (2009) Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene cluster on chromosome 5q31 in Wilm's tumor. *PLoS Genetics*, 5 (11): e1000745. doi: 10.1371/annotation/012d5a44-8239-4057-8c3b-3dc159ea3a02.
- De Grujil, F.R., Van Kranen, H.J., Mullunders, L.H. (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol*, 63: 19-27.
- Degterev, A., Yuan, J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Molecular Cell Biology Reviews*, 9: 378-390.
- Delmas, E., Beermann F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., Demirhan, N., Bastian, B.C., Goding, C.R., Larue, L. (2007) Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Development*, 21: 2923-2935.
- Delva, E., Kowalczyk, A.P. (2009). Regulation of cadherin trafficking. *Traffic*, 10: 259-267.
- Dobroff, A., Rodrigues, E.G., Moraes, J.Z., Travassos, L.R. (2002) Protective, anti-tumor monoclonal antibody recognizes a conformational epitope similar to melibiose at the surface of invasive murine melanoma cells. *Hybridoma and Hybridomics*, 21 (5): 321-331.
- Dobroff, A.S., Rodrigues, E.G., Friaça, D.M., Nakayasu, D.S., Almeida, I.C., Mortara, R.A., Jacysyn, J., Amarante-Mendes, G.P., Magliani, W., Conti, S., Polonelli, L., Travassos, L.R. (2010) Differential antitumor effects of IgG and IgM monoclonal antibodies and their synthetic complementary determining regions directed to new targets of B16F10-Nex2 melanoma cells. *Translational Oncology*. Em publicação.
- Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Gonçalves-Trentin, A., Le Douarin, N.M. (2007) Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol*, 330 (6-7): 521-529.
- Eberle, J., Fecher, L.F., Hossin, A.M., Kurbanov, B.M., Fechner, H. (2008) Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma. *Experimental Dermatology*, 17: 1-11.
- Fang, D., Leishear, K., Nguyen, T.K., Finko R., Cai, K., Fukunaga, M., Li, I., Brafford, P.A., Kulp, A.N., Xu, X., Smalley, K.S., Herlyn, M. (2006) Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 24 (7): 1668-1677.
- Fidler, I.J. (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research*, 35: 218-224.

- Fu, Z., Tindall, D.J. (2008) FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*, 27: 2312-2319.
- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Vitale, I., Rigoni, A., Vacchelli, E., Michaud, M., Zischka, H., Castedo, M., Kroemer, G. (2010) Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med*, 31 (1): 1-20.
- Garbe, C., Leiter, U. (2009) Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*, 27: 3-9.
- Garrigues, J., Garrigues, U., Hellström, I., Hellström, K.E. (1993). Le^y specific antibody with potent anti-tumor activity is internalized and degraded in lysosomes. *American Journal of Pathology*, 142 (2): 607-622.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R. (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445: 851-857.
- Gruss, C., Herlin, M. (2001) Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Opin Oncol*, 13: 117-123.
- Haass, N.K., Smalley, K.M.S., Li, L., Herlin, M. (2005) Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res*, 18: 150-159.
- Haruki, S., Imoto, I., Kozaki, K., Matsui, T., Kawachi, H., Komatsu, S., Muramatsu, T., Shimada, Y., Kawano, T., Inazawa, J. (2010) Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 31 (6): 1027-1036.
- Houghton, A.N., Mintzer, D., Cordon-Cardo, C., Welt, S., Fliegel, B., Vadhan, S., Carswell, E., Melamed, M.R., Oettgen, H.F., Old, L.J. (1985) Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *PNAS*, 82: 1242-1246.
- Hu, X.F., Li, J., Vandervalk, S., Wang, Z., Magnuson, N.S., Xing, P.S. (2009) PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing AKT phosphorylation, and activating apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (2): 362-375.
- Imoto, I., Izumi, H., Yokoi, S., Hosoda, H., Shibata, T., Hosoda, F., Ohki, Hirohashi, S., Inazawa, J. (2006) Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers. *Cancer Research*, 66(9): 4617-4626.
- Ivanov, A.I., Nusrat, A., Parkos, C.A. (2004) Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Molecular Biology of the Cell*, 15:176-188.
- Jin, T., Fantus, I.G., Sun, J. (2008) Wnt and beyond Wnt: Multiple mechanisms control the transcription property of β -catenin. *Cellular Signaling*, 1697-1704.

- Junghans, D., Heidenreich, M., Hack, I., Taylor, V., Frotscher, M., Kemler, R. (2008) Postsynaptic and differential localization to neuronal subtypes of protocadherin $\beta 16$ in the mammalian central nervous system. *Europ J Neurosc*, 27: 559-571.
- Kamstrup, M.R., Gniadeck, R., Skovgaard, G.L. (2007) Putative cancer stem cells in cutaneous malignancies. *Experimental Dermatology*, 16: 297-301.
- Klaus, A., Birchmeier, W. (2008) Wnt signaling and its impact on development and cancer. *Nature Cancer Reviews*, 8: 387-398.
- Krahn, M.P., Rizk, S., Alfalah, M., Behrendt, M., Naim, H.Y. (2010) Protocadherin of the liver, kidney, and colon associates with detergent-resistant membranes during cellular differentiation. *J Biol Chem*, 285 (17): 13193-13200.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandnabeele, P., Abrams, J., Anemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 16, 3-11.
- Lai, S-H., Chien, A.J., Moon, R.T. (2009) Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Research*, 19: 532-545.
- Levi, M., Sallberg, M., Ruden, U., Herlyn, D., Maruyama, H., Wigzell, H., Marks, J., Wahren, B. (1993) A complementary-determining region synthetic peptide acts as a miniantibody and neutralizes human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *PNAS*, 90: 4374-4378.
- López-Requena, A., de Acosta, C.M., Moreno, E., Gonzalez, M., Puchades, Y., Talavera, A., Vispo, N.S., Vazquez, A.M., Perez, R. (2007) Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies I. Towards a molecular dissection of an idiotype-anti-idiotype system. *Mol Immunol*, 44: 423-433.
- Mani, I., Sharma, V., Tamboli, I., Raman, G. (2001) Interaction of melanin with proteins - The importance of an acidic intramelanosomal pH. *Pigment Cell Res*, 14: 170-179.
- Marquette, A., Bagot, M., Bensussan, A., Dumaz, N. (2007) Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implication. *Arch Immunol Ther Exp*, 55: 363-372.
- Melnikova, V.O., Bar-Eli, M. (2006) Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8. *Pigment Cell Res*, 19: 395-405.
- Mezhybovska, M., Yudina, Y., Abhyankar, A., Sjölander, A. (2009) β -catenin is involved in alterations in mitochondrial activity in non-transformed intestinal epithelial and colon cancer cells. *British Journal of Cancer*, 101:1596-1605.

- Miki, R., Yagi, T., Hattori, K., Taguchi, Y., Tada, M.N., Isosaka, T., Hidaka, Y., Hirabayashi, T., Hashimoto, R., Fukuzako, H. (2005) Identification and characterization of coding single-nucleotide polymorphisms within human protocadherin- α and - β gene clusters. *Gene*, 349: 1-14.
- Mills, L., Tellez, C., Huang, S., Baker, C., McCarty, M., Green, L., Gudas, J.M., Feng, X., Bar-Eli, M. (2002) Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Research*, 62: 5106-5114.
- Mimeault, M., Hauke, R., Mehta, P.P., Batra, S.K. (2007) Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancer. *J Cell Mol Med*, 11 (5): 981-1011.
- Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S., Giles, F. (2008) Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research*, 14 (16): 5000-5005.
- Miyamoto, K., Fukutomi, T., Akashi-Tanaka, S., Hasegawa, T., Asahara, T., Sugimura, T., Ushijima, T. (2005) Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer*, 116 (3): 407-414.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451: 1069-1075.
- Mohr, P., Eggermont, A.M.M., Hauschild, A., Buzaid, A. (2009) Staging of cutaneous melanoma. *Annals of Oncology*, 20 (Supplement 6): vi14-vi21.
- Morishita, H., Yagi, T. (2007) Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 19:584-592.
- Mueller, D.W., Bosserhoff, A.K. (2009) Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. *British Journal of Cancer*, 101: 551-556.
- Narayan, G., Scotto, L., Neelakantan, V., Kottoor, S.H., Wong, A.H., Loke, S.L., Mansukhani, M., Pothuri, B., Wright, J.D., Kaufmann, A.M., Schneider, A., Arias-Pulido, H., Tao, Q., Murty, V.V. (2009) Protocadherin PCDH10, involved in tumor progression, is a frequent and early target of promoter hypermethylation in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 48 (11): 983-992.
- Ohno, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Masuko, K., Hashimoto, Y., Masuko, T. (2008) Simultaneous induction of apoptotic, autophagic, and necrosis-like cell death by monoclonal antibodies recognizing chicken transferring receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367: 775-781.
- Okazaki, N., Takahashi, N., Kojima, S., Masuho, Y., Koga, H. (2002) Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis*, 23:1139-1148.

- Ose, R., Yanagawa, T., Ikeda, S., Ohara, O., Koga, H. (2009) PCDH24-induced contact inhibition involves downregulation of β -catenin signaling. *Molecular Oncology*, 3: 54-66.
- Palmiere, G., Capone, M., Ascierto, M.L., Gentilcore, G., Stroncek, D.F., Casula, M., Sini, M.C., Palla, M., Mozzillo, N., Ascierto, P.A. (2009) Main roads to melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 7:86.
- Parenti, S., Ferrarini, F., Zini, R., Montanari, M., Losi, L., Canovi, B., Ferrari, S., Grande A. (2009) Mesalazine inhibits the β -catenin signalling pathway acting through the upregulation of μ -protocadherin gene in colo-rectal cancer cells. *Aliment Pharmacol Ther*, 31, 108-119.
- Parmiani, G., Castelli, C., Santinami, M., Rivoltini, L. (2007) Melanoma immunology: past, present and future. *Curr Opin Onc*, 19: 121-127.
- Pasqualini, R., Arap, W. (2004) Hybridoma-free generation of monoclonal antibodies. *PNAS*, 101(1): 257-259.
- Pla, P., Larue, L., Moore, R., Morali, O.G., Grille, S., Martinuzzi, S., Delmas, V. (2001) Cadherins in neural crest cell development and transformation. *J Cell Physiol*, 189: 121-132.
- Pollock, P.M., Hayward, N. (2002) Mutations in exon 3 of the beta-catenin gene are rare in melanoma cell lines. *Melanoma Research*, 12: 183-186.
- Pukel, C.S., Lloyd, K.O., Travassos, L.R., Dippold, W.G., Oettgen, H.F., Old, L.J. (1982) GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *J Exp Med*, 155: 1133-1147.
- Reichert, J.M., Valge-Archer, V.E. (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nature Drug Discovery Reviews*, 6: 349-159.
- Riedl, S.J., Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Molecular Cell Biology Reviews*, 5: 897-907.
- Rosenstock, T.R., Carvalho, A.C., Jurkiewicz, A., Frussa-Filho, R., Smaili, S.S. (2004) Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem*, 88 (5): 1220- 1228.
- Runnels, H.A., Arbuckle, J.A., Bailey, K.S., Nicastro, P.J., Sun, D., Pegg, J.A., Meyer, D.M., Evans, M., Bono, C.P., Lie, W.R., Moffat, M.A., Casperson, G.F., Lennard, S., Elvin, J., Vaughan, T., Smith, C.E., Morton, P.A. (2010) Human monoclonal antibodies to the insulin-like growth factor 1 receptor inhibit receptor activation and tumor growth in preclinical studies. *Adv Ther*. Epub ahead of print.
- Schrama, D., Reisfeld, R.A., Becker, J.C. (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nature Drug Discovery Reviews*, 5: 147-159.
- Shirai, H., Kidera, A., Nakamura, H. (1999) H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Lett*, 455: 188-197.

- Simon, A.K., Newsom-Davis, T., Frayne, M.E.F., Ch'en, P.F.T., McMichael, A.J., Screaton, G.R. (2008) Generation of tumour-rejecting anti-carbohydrate monoclonal antibodies using melanoma modified with Fas ligand. *International Immunology*, 20 (4): 525-534.
- Soiffer, R.J., Chapman, P.B., Murray, C., Williams, L., Unger, P., Collins, H., Houghton, A.N., Ritz, J. (1997). Administration of R24 monoclonal antibody and low-dose interleukin 2 for malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 3: 17-24.
- Sulaimon, S.S., Kitchell, B.E. (2003) The basic biology of malignant melanoma: Molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. *J Vet Int Med*, 17: 760-772.
- Suzuki, S. (2000) Recent progress in protocadherin research. *Experimental Cell Research*, 261:13-18.
- Takahashi, Y., Nishikawa, M., Takakura, Y. (2006) Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targetin β -catenin or hypoxia-inducible factor 1 α . *Journal of Controlled Release*, 116: 90-95.
- Takahashi, Y., Nishikawa, M., Suehara, T., Takiguchi, N., Takakura, Y. (2008) Gene silencing of β -catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice. *Int J Cancer*, 123: 2315-2320.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Molecular Cell Biology Reviews*, 9: 231-241.
- Terry, S., Queires, L., Gil-Diez-de-Medina, S., Chen, M.W., de la Taille, A., Allory, Y., Tran, P.L., Abbou, C.C., Buttyan, R., Vacherot, F. (2006) Protocadherin-PC promotes androgen-independent prostate cancer cell growth. *Prostate*, 66 (10): 1100-1113.
- Torres, V.A., Tapia, J.C., Rodriguez, D.A., Lladser, A., Arredondo, C., Leyton, L., Quest, A.F.G. (2007) E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of apoptosis protein surviving via reduced β -catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 27 (21): 7703-7717.
- Uong, A., Zon, L.I. (2010) Melanocytes in Development and Cancer. *J Cell Physiol*, 222: 38-41.
- Vanhaslt, K., van Roy, F., Kools, P., Eynde, E.V. (2001) The human and murine protocadherin- β one-exon gene families show high evolutionary conservation, despite the difference in gene number. *FEBS Letters*, 495: 120-125.
- Wang, K.H., Liu, H.W., Lin, S.R., Ding, D.C., Chu, T.Y. (2009) Field methylation silencing of the protocadherin 10 gene in cervical carcinogenesis as a potential specific diagnostic test from cervical scrapings. *Cancer Science*, 100 (11): 2175-2180.
- Weber, J. (2008) Overcoming immunologic tolerance to melanoma: targeting CTLA-4 with ipilimumab (MDX-010). *Oncologist*, 13, Suppl 4: 16-25.

- Weiner, L.M. (2007) Building better magic bullets – improving unconjugated monoclonal antibody therapy for cancer. *Nature Cancer Reviews*, 7: 701-706.
- Wilsinson, S., Ryan, K.M. (2010) Autophagy: an adaptable modifier of tumorigenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20: 57-64.
- Worm, J., Christensen, C., Gronbaek, K., Tulchinsky, E., Guldberg, P. (2004) Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene*, 23:5215–5226.
- Wu, Q., Zhang, T., Cheng, J.F., Kim, Y., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Noonan, J.P., Zhang, M.Q., Myers, R.M. (2001) Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome Research*, 11: 389-404.
- Yagi, T. (2008) Clustered protocadherin family. *Develop Growth Differ*, 50, 131-140.
- Yang, X., Buttyan, R., Chen, M.W., Terry, S., Vacherot, F., Chopin, D.K., Bemis, D.L., Kitajewski, J., Benson, M.C., Guo, Y. (2005) A human- and male-specific protocadherin that acts through the Wnt signaling pathway to induce neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Cancer Research*, 65: (12), 5263-5271.
- Yin, B.W.T., Kiyamova, R., Chua, R., Caballero, O.L., Gout, I., Gryshkova, V., Bhaskaran, N., Souchelnytskyi, S., Hellman, U., Filonenko, A.A., Odunsi, K., Lloyd, K.O., Old, L.J., Ritter, G. (2008). Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immunity*, 8: 3-11.
- Ying, J., Seng, T.J., Langford, C., Srivastava, G., Tsao, S.W., Putti, T., Murray, P., Chan, A.T., Tao, Q. (2006) Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation. *Oncogene*, 25: 1070-1080.
- Ying, J., Gao, Z., Li, H., Srivastava, G., Murray, P.G., Goh, H.K., Lim, C.Y., Wang, Y., Marafioti, T., Mason, D.Y., Ambinder, R.F., Chan, A.T., Tao, Q. (2007) Frequent epigenetic silencing of protocadherin 10 by methylation in multiple haematologic malignancies. *Br J Haematol*, 136 (6): 829-832.
- Yu, B., Yang, H., Zhang, C., Wu, Q., Shao, Y., Zhang, J., Guan, M., Wan, J., Zhang, W. (2010) High-resolution melting analysis of PCDH10 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers. *Neoplasma*, 57 (3): 247-252.
- Yu, J., Cheng, Y.Y., Tao, Q., Cheung, K.F., Lam, C.N., Geng, H., Tian, L.W., Wong, Y.P., Tong, J.H., Ying, J.M., Jin, H., To, K.F., Chan, F.K., Sung, J.J. (2009) Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Gastroenterology*, 136 (2): 640-651.
- Yu, J.S., Koujak, S., Nagase, S., Li, C.M., Su, T., Wang, X., Keniry, M., Memeo, L., Rojzman, A., Mansukhani, M., Hibshoosh, H., Tycko, B., Parsons, R. (2008) PCDH8, the

human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene*, 27 (34): 4657-4665.

- Zhu, H., Zhang, G., Wang, Y., Xu, N., He, S., Zhang, W., Chen, M., Liu, M., Quan, L., Bai, J., Xu, N. (2010) Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. *Cancer Sci*, 101 (5): 1156-1162.
- Zigler, M., Villares, G.J., Lev, D.C., Melnikova, V.O., Bar-Eli, M. (2008). Tumor immunotherapy in melanoma: strategies for overcoming mechanisms of resistance and escape. *Am J Clin Dermatol*, 9: 307-311.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G. (2008) Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Immunology Reviews*, 8: 59-71.

ANEXOS

I. COMITÊ DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de agosto de 2008.
CEP 1115/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) LUANA CHEVEN PERBORE DOS SANTOS

Co-Investigadores: Elaine Guadalupe Rodrigues (orientador), Luiz Rodolpho Travassos

Disciplina/Departamento: Biologia Celular/Micro, Imuno e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: CNPq.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Mecanismo de citotoxicidade do anticorpo monoclonal A4, protetor no modelo de melanoma murino B16F10-Nex2, em células tumorais de melanomas murino e humano**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Determinação do possível mecanismo de citotoxicidade do anticorpo monoclonal A4 e do peptídeo sintético H3, referente à região hipervariável CDR3 da cadeia pesada do mAb A4, em melanomas murino e humano..

RESUMO: Estudo com 30 camundongos Balb/c. Eutanásia: deslocamento cervical. Este estudo visa verificar a expressão da PCDHB13 em células de melanoma humano sensíveis ou não ao mAb A4/ HeA4, e comparar a expressão dessa molécula entre células de melanoma murino e melanócitos murinos imortalizados não tumorigênicos (Melan A). A clonagem e o seqüenciamento do cDNA do gene codificador da PCD HB13 presente na célula tumoral murina e humana deverá ser realizada, para fazer-se uma comparação com a seqüência da molécula de células não -tumorigênicas, verificando-se a presença de mutações, alteração comumente encontrada em proteínas de células tumorais. Pretende-se determinar se existe uma via de sinalização envolvida, e qual é esta via na interação entre o mAb A4/HeA4 e PCDHB13, levando à elucidação do mecanismo de ação citotóxica anti-tumoral do mAb e do peptídeo derivado..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Anticorpo monoclonal A4 e o seu CDR H3 reconhecem um antígeno de superfície nas células tumorais murinas. A interação do mAb A4/H3A4 com o ligante induziu a morte da célula in vitro, e a transferência passiva do mAb reduziu significativamente o crescimento subcutâneo e o número de nódulos pulmonares em animais tratados..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos e técnicas empregadas, estando este estudo inserido na linha de pesquisa da orientadora.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CNPq.

CRONOGRAMA: 24 meses.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 10/8/2009 e 10/8/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

II. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO EM CONGRESSOS

1) XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology & II Extra Section of Clinical Immunology. 18 a 22 de outubro de 2008. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Trabalho escolhido para apresentação na seção *Express Presentations*.

DOBROFF, AS; SANTOS, LCP; NAKAYASU, ES; ALMEIDA, IC; TRAVASSOS, LR & RODRIGUES, EG. A new marker and therapeutic target against melanoma: Protocadherin Beta 13 in murine and human melanoma cells is recognized by cytotoxic monoclonal antibody A4.

2) XXXIV Congress of the Brazilian Society for Immunology and X International Symposium on Allergy and Clinical Immunology. 26 de setembro de 2009. Salvador, Bahia, Brasil.

SANTOS, LCP; ARRUDA, DC; DOBROFF, AS; NAKAYASU, ES; ALMEIDA, IC; TRAVASSOS, LR & RODRIGUES, EG. Protocadherin Beta 13 recognition by monoclonal antibody A4 triggers apoptosis in murine and human cancer cells.

3) XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular. 18 a 21 de maio de 2010. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

SANTOS, LCP; ARRUDA, DC; MORTARA, RA; TRAVASSOS, LR & RODRIGUES, EG. Protocadherin Beta 13 targeting by monoclonal antibody A4 inhibits beta-catenin signaling and induces apoptosis in melanoma.

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](#)