

ANDRESSA ANTUNES PRADO DE FRANÇA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE DESMOGLEÍNA 1 E
DESMOPLAQUINA NAS LINHAGENS DE CÉLULAS EPITELIAIS
MDCK E MCF-7 ANTES E APÓS UMA TRANSIÇÃO FENOTÍPICA
DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F814a
2008

França, Andressa Antunes Prado de, 1982-

Análise da expressão de desmogleína 1 e desmoplaquina nas
linhagens de células epiteliais MDCK e MCF-7 antes e após
uma transição fenotípica de crescimento / Andressa Antunes
Prado de França. – Viçosa, MG, 2008.
ix, 61f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marcelo José Vilela.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 51-61

1. Cultura de células. 2. Moléculas – Aderência celular.
3. Células – Proliferação. 4. Proteína – Análise. 5. Tumores –
Crescimento. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 572.865

ANDRESSA ANTUNES PRADO DE FRANÇA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE DESMOGLEÍNA 1 E
DESMOPLAQUINA NAS LINHAGENS DE CÉLULAS EPITELIAIS
MDCK E MCF-7 ANTES E APÓS UMA TRANSIÇÃO FENOTÍPICA
DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 4 de julho de 2008.

Prof. José Eduardo Serrão

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)

Prof. Marcelo Lobato Martins
(Co-Orientador)

Prof. Marcelo José Vilela
(Orientador)

DEDICATÓRIA

“...e o que importa não é o que você tem na vida, mas **quem** você tem na vida...”

Aos meus pais Aurea e Paulo,

A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Vocês que se doaram inteiros, muitas vezes abrindo mão de seus sonhos para que eu pudesse ter os meus realizados. A vocês que iluminaram meu caminho com tanta dedicação e amor, para que ele fosse trilhado sem medo e com alegria. Pais de coração. Pais de verdade. MEUS pais!

Vocês me ensinaram que na vida devemos lutar... E me ensinaram que meu sucesso depende de mim. Sem vocês, meus pilares, vocês que me ensinaram a distinguir o certo do errado, vocês que me ensinaram o que é o amor, o que é uma família de verdade, mesmo que não estejam todos juntos. Vocês que me abraçaram e me deram a força necessária pra sempre ir em frente e seguir meu caminho. Sem vocês, não teria sentido... Obrigada por cada conselho, cada conversa, cada carinho, cada minuto de atenção, cada vibração ao meu lado. Obrigada por me amarem tanto, e sempre tanto. Obrigada por serem pais tão fabulosos, tão espetaculares. Obrigada por serem meus pais!

Ao meu irmão Renan,

Renan, meu irmão, meu filho... meu presente de Natal. Estava escrito que você sempre pertenceu ao nosso lado. Você é a prova de que amor à primeira vista existe... Você é meu coração! E Felipe, meu irmão, meu afilhadinho... Tão pequeno e tão necessário. A vida cabe em suas mãozinhas. E meu mundo cabe em seu sorriso...

A todos vocês, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo José Vilela,

Agradeço por vários motivos...

Agradeço pela oportunidade que me foi concedida, e pelos ensinamentos transmitidos. Agradeço pela confiança, força, e presteza. Agradeço por cada minuto de atenção e dedicação. Agradeço pelo carinho e respeito de todos os dias, pelas conversas, pelas sábias comparações e exemplos de vida, idéias compartilhadas, risadas, puxões de orelha necessários. Agradeço por ser além de orientador, um mestre que sabe ser amigo. Agradeço por me ajudar a prosseguir após cada queda, por me ajudar a encarar cada dificuldade, tomar as rédeas da situação e crescer. Agradeço por compartilhar de minha alegria, apreensão, alívio e todos os outros sentimentos de todo esse tempo. Agradeço, acima de tudo, pelo reconhecimento. Muito obrigada por tudo, ***Professor!***

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), agradeço pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral pelas oportunidades oferecidas.

Ao Professor Abelardo Silva Junior, e a equipe de seu laboratório, do Departamento de Medicina Veterinária, pelo apoio e presteza no momento mais crítico da execução deste trabalho.

Ao Professor Marcelo Lobato Martins, pelos esclarecimentos valiosos de conceitos indispensáveis para a realização deste experimento.

Ao Professor Sérgio Oliveira de Paula, pelo apoio e disponibilidade no momento de crise.

Ao Professor José Eduardo Serrão, coordenador do curso de Biologia Celular e Estrutural, pela compreensão e orientação em vários momentos da execução deste trabalho.

A Professora Silvia das Graças Pompolo, pela disponibilização de equipamentos necessários a esta pesquisa.

Aos companheiros de trabalho, um agradecimento especial pelo companheirismo de todos os dias. Dias bons e dias ruins. Foram muitos altos e baixos ao longo do caminho. E vocês sempre ao meu lado.

Renatinha, meu braço direito em todos os momentos, e em outros tantos, o esquerdo também. Muito obrigada pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço infinitamente sua presença sempre ao meu lado. Sua força me ajudou a concluir esse trabalho.

Rose, Carine, Lorena, Juliano, Marquinhos, e também os demais que estiveram em nosso LabCan por um período mais curto. Vocês que acompanharam todo esse trajeto, e fizeram parte dessa etapa importante da minha vida. Vocês tornaram os longos dias de trabalho muito mais agradáveis!

Às pessoas tão especiais em minha vida.

À minha família. Família que está longe, sem nunca deixar de estar ao lado. Família guerreira, família sofrida, família doce, minha família.

A todos os amigos que estão perto... Os amigos que estão longe. Enfim! A todos que moram em meu coração. Agradeço a vocês sem obedecer a uma ordem. Cada um tem seu papel especial em minha vida e contribuiu de uma forma ou outra para a execução (ou para a finalização) deste trabalho.

Às amigas **Michele e Ellen**. Duas irmãs que ganhei. Pessoas gigantes, que tanto me ensinaram. Pilares importantes no meu caminho, mesmo quando estão longe. Necessárias? Mais do que isso. Simplesmente essenciais... Obrigada por serem tão especiais! Quero ser como vocês quando eu crescer!

Ao grande amigo **Dennys**, meu amigão! Pessoas são capazes de criar e manter laços fortes, independente do tempo passado, da distância ou do estado civil. Um verdadeiro amigo, que por mim, sei que arruma até “pinga de caju”! Obrigada por ser tão absurdamente magnífico!

Ao **João**, anjo de todos os meus dias. Obrigada por todo o apoio de sempre, compreensão, carinho e infinita paciência. Você tornou os últimos meses de dificuldades menos dolorosos. Obrigada por ter chegado e permanecido. Obrigada por ter me carregado nos ombros até o final, e ter me ajudado a enxergar longe. Levo você no coração...

A todos vocês, muitíssimo obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Cultura de células.....	4
2.2 Padrões de crescimento de células em cultura, geometria fractal e transição fenotípica.....	5
2.3 Tecido epitelial	10
2.3.1 Junções intercelulares	11
2.4 Desmossomas.....	13
2.4.1 Distribuição	14
2.4.2 Estrutura e função dos desmossomas	14
2.4.3 Proteínas desmossômicas	16
2.5 Caderinas	18
2.5.1 Caderinas clássicas	20
2.5.2 Caderinas desmossômicas	21
2.6 Desmogleína	24
2.6.1 Estrutura e funções	24
2.6.2 Desmogleína e o câncer	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Cultura de células.....	29
4.1.1 Descrição das linhagens celulares	29
4.1.2 Procedimentos básicos de cultura de células.....	29
4.2 Protocolo dos experimentos.....	32
4.2.1 Plaqueamento das células	32
4.2.2 Caracterização das linhagens celulares.....	33
4.2.3 Preparo das amostras de proteínas para eletroforese	33
4.2.4 Eletroforese (SDS-PAGE) e eletrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose (<i>Western blotting</i>).....	34
4.2.5 Anticorpos monoclonais	35
4.2.6 Revelação pelo método do complexo Avidina - Biotina.....	36
4.2.7 Técnica de Imunofluorescência	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Western blot.....	38
5.2 Imunofluorescência.....	40
6 CONCLUSÕES.....	49
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

FRANÇA, Andressa Antunes Prado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho, 2008. **Análise da expressão de desmogleína 1 e desmoplaquina nas linhagens de células epiteliais MDCK e MCF-7 antes e após uma transição fenotípica de crescimento.** Orientador: Marcelo José Vilela. Co-orientadores: Marcelo Lobato Martins e Clóvis Andrade Neves.

Estudos anteriores identificaram uma alteração no padrão de crescimento de algumas linhagens celulares cultivadas em monocamada, dentre elas as células MDCK, derivadas de epitélio normal de rim de cão, e as células MCF-7, derivadas de carcinoma de mama humana. Nas células MDCK, foi observada uma transição de um comportamento exponencial para um regido por distribuição em leis de potência. Já nas células MCF-7, a transição observada comportou-se de maneira contrária, de uma distribuição em leis de potência para um decaimento exponencial. No presente estudo, foi analisada a expressão da proteína de adesão desmogleína (Dsg) por meio de *western blot* e imunofluorescência, usando-se amostras das linhagens supracitadas antes e após a transição fenotípica de crescimento. Assim, amostras de MDCK foram retiradas antes de 76 horas e após 146 horas do plaqueamento, e amostras de MCF-7 foram retiradas antes de 64 horas e após 140 horas, para análise da caderina desmossômica. Após a obtenção das quatro amostras, estas tiveram seu perfil protéico caracterizado por meio de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida a 8%, e em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, por meio de transferência eletroforética, e a presença da desmogleína foi revelada com solução do anticorpo monoclonal 32-2B, específico para isoforma 1. Os resultados do *western blot* indicaram que as amostras de MCF-7 apresentavam maior expressão de Dsg1 que as MDCK, sendo que as MCF-7 antes da transição apresentam a maior expressão de Dsg1, e dentre as MDCK, a amostra obtida após a transição apresentou nível mais elevado de Dsg1. Para realização da imunofluorescência, as amostras das duas linhagens foram obtidas nos mesmos tempos citados para as amostras para eletroforese. As células haviam sido plaqueadas sobre lamínulas de 13mm em placas de 24 poços, sendo então fixadas e marcadas com anticorpo primário 11-5F, contra outra proteína desmossômica, a desmoplaquina, e em seguida com anticorpo secundário

marcado com FITC. O resultado da imunofluorescência indica maior concentração de proteínas desmossômicas organizadas na membrana celular nas células MCF-7 antes da transição, em relação à amostra retirada após a transição, e nas MDCK, maior marcação após a transição, sendo que, de forma condizente com o resultado do *western blot*, as células MCF-7 apresentaram marcação mais intensa que as MDCK para as proteínas desmossômicas. Os resultados deste experimento indicam uma relação entre os níveis de expressão da Dsg e o regime de crescimento das linhagens celulares analisadas, de modo que a possível atuação desta proteína em vias de controle do ciclo celular deve ser discutida.

ABSTRACT

FRANÇA, Andressa Antunes Prado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Analysis of the expression of desmoglein 1 and desmoplakin in the epithelial cell lines MDCK and MCF-7 before and after a phenotypic growth transition.** Adviser: Marcelo José Vilela. Co-advisers: Marcelo Lobato Martins and Clóvis Andrade Neves.

Previous studies have identified an alteration in the growth pattern of some established cell lines cultured in monolayer, like MDCK cells, derived from normal canine kidney epithelium, and MCF-7 cells, obtained from human breast carcinoma. On MDCK cells, a transition from an exponential behavior to a power-law distribution was observed. On MCF-7 cells, the observed transition behaved the opposite way, changing from a power law to an exponential decay. In the present study, the expression of the adhesion protein desmoglein (Dsg) was analysed by western blot and immunofluorescence, using samples from the mentioned cell lines before and after the growth phenotypic transition. Thus, samples from MDCK cells were taken before 76 hours and after 146 hours from plating, and samples from MCF-7 cells, before 64 hours and after 140 hours, for the analysis of the desmosomal cadherin. After obtaining the four samples, they had their protein profile characterized by one dimension electrophoresis in polyacrilamide gel 8%, following which the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane, by electrophoretic transfer, and the presence of desmogleína was revealed with a solution from the monoclonal antibody 32-2B, specific to isoform 1. The results from the western blot indicate that the samples from MCF-7 presented higher expression of Dsg1 than MDCK. MCF-7 before the transition had the highest expression of Dsg1, and between the samples of MDCK, the one obtained after the transition showed higher expression of Dsg1. In order to perform the immunofluorescence, samples from the two cell lines were obtained in the same time mentioned before. The cells had been plated onto 13mm glass coverslips in 24-well plates, being fixed and marked with primary 11-5F antibody to another desmosome protein, desmoplakin, and then with secondary antibody marked with FITC. The results from immunofluorescence indicate higher concentration of desmosomal proteins in

the cell membrane of MCF-7 cells before the transition, in relation to the sample from after the phenotypic growth transition, and in MDCK cells, more intense marking was seen after the transition, considering that the MCF-7 cell presented higher marking than MDCK for desmosomal proteins, in accordance with the results from the western blot. The results from this experiment indicate a relation between the level of expression of Dsg and the growth pattern into the studied cell lines, in such a way that a possible role of this protein in cell cycle control pathways should be further discussed.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer é considerado um dos fenômenos biológicos mais agressivos em relação à saúde humana. Muitos estudos se dedicaram a descrever e caracterizar o crescimento de células cancerosas, contudo, as lacunas ainda existentes no estudo destes mecanismos constituem falhas cruciais no combate a esta doença que, atualmente, acomete grande parte da população mundial. Somente no Brasil, em 2005, o câncer causou a morte de cerca de 190.000 pessoas, das quais 113.000 tinham menos de 70 anos de idade, estando colocado como a quarta principal causa de morte. O câncer de mama foi o principal tipo de tumor causador de morte entre as mulheres, e dentre os homens, os cânceres de traquéia, brônquios e pulmão (World Health Organization). Levando estes fatos em consideração, a busca por novas tecnologias que auxiliem no combate a esta doença é constante.

Estudos que acompanhem os modelos geométricos que regem os padrões de crescimento das células cancerosas poderiam ser determinantes no desenvolvimento de novas tecnologias mais eficientes de prognóstico, diagnóstico e tratamento. Tais informações poderiam auxiliar na compreensão das alterações no controle do ciclo celular envolvidas na aquisição do fenótipo tumoral, processo essencialmente dinâmico (VILELA & MARTINS, 1995).

Ao estudarem padrões de crescimento de células em cultura, Vilela e Martins (1995, 1998, 2003 e 2007) identificaram uma transição fenotípica, descrita por Mendes e Vilela (2001), vista preliminarmente pela mudança de regime de crescimento representado por curvas exponenciais ou aquelas regidas por leis de potência, em gráficos da função de distribuição de agregados celulares. Atualmente, dados de análises de proteomas, expressão diferencial de proteínas – entre elas a calreticulina (VILELA et al., 2007) –, microscopia eletrônica e biologia molecular têm fornecido informações que dão suporte à existência da transição fenotípica utilizada neste trabalho como modelo experimental.

Os padrões de crescimento de células normais e cancerosas em cultura foram caracterizados, em estudos anteriores (VILELA et al., 1998; MENDES et al., 2001; VILELA et al., 2003; VILELA et al., 2007), pela função de distribuição do tamanho de agregados celulares, e as linhagens MDCK e MCF-7, objetos de estudo do presente trabalho, apresentaram uma transição no regime de crescimento. No caso das MDCK, a transição fenotípica ocorre por meio da mudança de um comportamento exponencial para um crescimento regido por uma distribuição em leis de potência. Nas MCF-7, a transição encontrada é a partir do crescimento regido por leis de potência para um comportamento exponencial, em diferentes tempos em cultura. As evidências das pesquisas sugerem que essa transição possa estar associada a alterações nos mecanismos reguladores da replicação celular, bem como às alterações na expressão de moléculas de adesividade celular.

Desmossomas são junções intercelulares de adesão, presentes em células epiteliais e músculo cardíaco, além de meninges e do cristalino de bovinos, e células dendríticas foliculares de linfonodos, que permitem o ancoramento de filamentos intermediários do citoesqueleto das células (VILELA, 1989; GARROD et al., 2002; CHIDGEY & DAWSON, 2007; GREEN & SIMPSON, 2007).

Uma vez que cerca de 90% dos cânceres humanos são carcinomas, tumores originados a partir de células epiteliais, os desmossomas constituem uma importante ferramenta para o diagnóstico de carcinoma (VILELA et al., 1989; GARROD, 1993). Além disso, pesquisas recentes atestam a importância das proteínas desmossômicas na formação de tumores, por sua atuação em vias de sinalização celular fundamentais à proliferação, diferenciação e morfogênese celulares (GETSIOS et al., 2004; YIN & GREEN, 2004; CHEN et al., 2007; GARROD & CHIDGEY, 2008). Alterações da expressão de proteínas componentes dos desmossomas também estão relacionadas à adesividade celular modificada, o que pode exercer importantes efeitos

sobre as características de invasividade e metastatização de células cancerosas (YASHIRO et al., 2006).

A desmogleína é uma glicoproteína desmossômica da família das caderinas responsável pela adesividade dos desmossomas, sendo encontrada em quatro diferentes isoformas expressas diferencialmente nas camadas da epiderme, e tem sido relacionada a funções de controle do ciclo celular, além do seu papel na adesividade celular (GREEN & GAUNDRY, 2000; DUSEK et al., 2007; GREEN & SIMPSON, 2007).

Deste modo, constitui o objetivo principal desta tese analisar a expressão da desmogleína em duas linhagens celulares, uma normal (MDCK) e uma cancerosa (MCF-7), antes e após a transição fenotípica, por *western blotting* e imunofluorescência, a fim de se relacionar a expressão desta proteína com os diferentes padrões de crescimento celular encontrados em tempos de amostragem pré-estabelecidos. Da mesma forma que pela calreticulina, a transição fenotípica pode estar relacionada, também, à expressão diferenciada de moléculas de adesividade celular, como no caso presente, a desmogleína.

É nossa expectativa contribuir para o entendimento de rotas metabólicas relacionadas às transições fenotípicas que ocorrem durante o processo de transformação de células normais em cancerosas, estudando proteínas relacionadas à regulação do ciclo celular, adesividade intercelular e aos fenômenos de invasão e metástases, como a calreticulina e a desmogleína, como alvos terapêuticos do tratamento do câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura de células

O início da técnica de cultura de células é associado aos trabalhos de Roux, que em 1855 cultivou pela primeira vez a placa medular de pintos (CRUZ & VILELA, 1999). A partir de então, essa técnica vem sendo aprimorada ao longo do tempo com os inúmeros estudos desenvolvidos baseados na cultura de células.

O uso de cultura de células como método de estudo vem permitindo enormes avanços no conhecimento da biologia celular normal e alterada. As linhagens celulares constituem modelos experimentais adequados para, por exemplo, investigação da tumorigênese, diferenciação celular, resposta a tratamentos, regulação genética e caracterização de padrões de crescimento de células em cultura (SUNDSTROM et al., 1978; NADLER et al., 1981; PATTENGALÉ et al., 1981; SMITH Jr. et al., 1994; VILELA et al., 1995; VILELA et al., 1998).

Experimentos baseados em cultura de células constituem uma ferramenta chave na obtenção de novas informações e aprofundamento dos conhecimentos acerca dos mecanismos que controlam a proliferação celular e, conseqüentemente, o fenômeno neoplásico. A análise de dados sobre o crescimento celular certamente fornecerá dados importantes no estudo do comportamento de tumores humanos.

Células extraídas de tecidos normais podem ser cultivadas em condições experimentais, sendo capazes de crescerem e se dividirem em meio de cultura próprio. O número de divisões, nessas condições, é limitado, e geneticamente predeterminado a ser interrompido, de modo que as células passem a um estado de senescência, que culminará em sua morte, sendo específico para cada tipo de tecido e espécie em questão. As células que sobrevivem são imortalizadas, adquirindo a

capacidade de se dividirem indefinidamente. É a partir desse processo que são obtidas as culturas celulares estáveis.

As células cancerosas diferem das células normais transformadas, mantidas em cultura, por serem fundamentalmente imortalizadas, transformadas e capazes de invadir tecidos adjacentes e gerar focos de metástase (LOPES et al., 2005).

A busca do esclarecimento dos mecanismos de formação e crescimento de células cancerosas é justificada pela possível utilização de tais conhecimentos no aprimoramento de técnicas de prevenção, prognóstico, diagnóstico e tratamento do câncer.

2.2 Padrões de crescimento de células em cultura, geometria fractal e transição fenotípica

O estudo dos padrões de crescimento celulares pode fornecer informações sobre as interações entre as células, e entre as mesmas e seus microambientes, bem como sobre os fenômenos de invasão e metástases, essenciais para o diagnóstico e tratamento do câncer, além de ampliar o conhecimento sobre a biologia dessa doença.

A descrição de tais padrões de organização pode ser feita utilizando-se diferentes abordagens matemáticas, incluindo as topológicas, algébricas e as geométricas (clássica ou fractal) (VILELA et al., 1998).

O conceito de geometria fractal apresenta influência considerável na matemática e tem encontrado muitas aplicações nas ciências físicas e biológicas (CROSS, 1997). Há na natureza uma grande quantidade de objetos irregulares e fragmentados, cuja complexidade não pode ser descrita de forma precisa em termos da geometria clássica ou Euclidiana, que considera apenas estruturas regulares e suaves, cujas dimensões são sempre números inteiros. Benoit Mandelbrot reconsiderou esse aspecto e propôs um novo tipo de geometria, a qual ele denominou

“geometria fractal” (do latim “frangere” – criar fragmentos irregulares), uma vez que admite dimensões fracionárias (MANDELBROT, 1982).

Uma das principais características da geometria fractal é que a forma de um objeto é invariável quando a escala é mudada, ou seja, a estrutura é similar (embora não necessariamente idêntica) em diferentes escalas de observação, e essa propriedade é chamada de *invariância de escala ou autossimilaridade* (WEIBEL, 1991) (Figura 1).

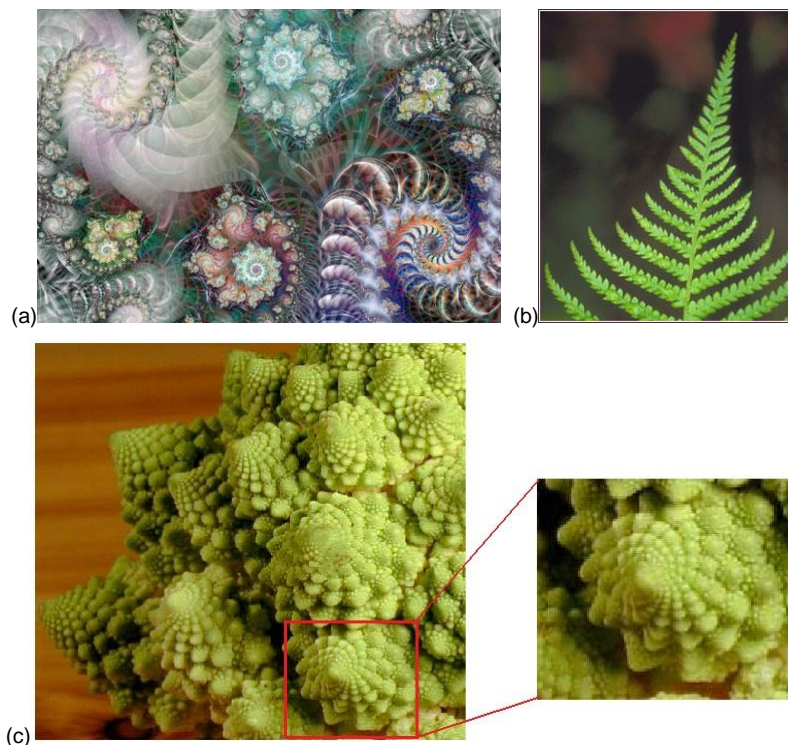


Figura 1 - (a) Objeto fractal criado a partir da utilização de algoritmos; (b) e (c) Objetos fractais encontrados na natureza; (b) Samambaia e (c) brócolis romanesco. Observar a irregularidade das bordas, bem como a similaridade existente entre as partes e o todo

Os fenômenos de crescimento responsáveis pelas formas irregulares e complexas da natureza constituem um vasto domínio para a aplicação da geometria dos fractais. Na biologia, a geometria fractal pode ser aplicada para descrição e entendimento de organismos biológicos, incluindo seu desenvolvimento e crescimento, sua arquitetura e suas propriedades funcionais. A análise de fractais tem sido aplicada no estudo das propriedades do crescimento de tumores, vasos sanguíneos e neurônios (BAISH & JAIN, 2000). Os conceitos de fractais também têm

sido incorporados em modelos de processos biológicos, tais como crescimento de células epiteliais e infecções virais (CROSS, 1997).

Recentemente, padrões de crescimento de células normais e cancerosas, estudadas *in vitro*, foram caracterizados medindo suas dimensões fractais, e os resultados obtidos sugerem uma possível abordagem quantitativa a ser utilizada no diagnóstico do câncer a partir da análise de imagens. Em um estudo anterior do crescimento de células normais e cancerosas, foram medidas individualmente as dimensões fractais dos agregados celulares gerados. Os resultados demonstraram que tanto as linhagens celulares normais quanto as linhagens de células cancerosas têm sua dimensão fractal (D_f) aumentada uniformemente em relação ao tempo até uma situação em que as células ocupam toda a lamínula, o que corresponde a uma $D_f = 2$. Entretanto, as taxas de crescimento são diferentes, o que permite distinguir as diferentes linhagens. Ademais, comparando-se diferentes linhagens em um mesmo tempo de amostragem, foi verificado que células cancerosas apresentam padrões mais ramificados e menos compactos que colônias de células normais, e este fato pode estar relacionado a maior mobilidade e tendência invasiva das células cancerosas (VILELA et al., 1995; MENDES et al., 2001; VILELA et al., 2003).

Vilela e Martins (comunicado pessoal) estudando a distribuição do tamanho de agregados celulares descobriram uma transição no regime de crescimento em células em cultura, descrita por Mendes et al. (2001). Experimentos foram realizados com o intuito de investigar as leis de escala que regem a dinâmica do crescimento celular. Utilizaram-se linhagens de células normais (MDCK), cancerosas da laringe (Hep-2) e cancerosas da língua humana (HN-5). Foi observado que a função que rege a distribuição do tamanho dos agregados variava ao longo do tempo, e que as células MDCK e Hep-2 apresentavam um padrão de crescimento inicial representado por um decaimento exponencial que é alterado para leis de potência. Este fato caracteriza matematicamente uma transição no regime de crescimento das células em estudo. A transição ocorre em

diferentes tempos, de acordo com a linhagem celular em análise. Nas células MDCK, a transição fenotípica ocorre no final de sua fase exponencial, enquanto nas Hep-2 ocorre durante a fase exponencial de crescimento (Figura 2).

O decaimento das funções é observado pelo fato de os agregados serem cada vez maiores e menos numerosos, com o passar do tempo em cultura. Para testar a natureza da transição fenotípica foram clonadas células MDCK antes e após a transição. Aquelas clonadas antes, apresentaram crescimento exponencial seguido pela transição para o regido por leis de potência; já as que foram clonadas após a transição apresentaram a dinâmica de crescimento regida apenas por leis de potência, em qualquer tempo observado. Tais fatos levaram à conclusão de que a transição estudada é um fenômeno não só de caráter fenotípico, mas genotípico e de natureza irreversível.

Em um estudo recente, Vilela et al. (2007) analisaram a dinâmica de crescimento das células cancerosas da mama, MCF-7 (dependente de estrógeno) e MDA-MB-231 (independente de estrógeno), e células normais da mama humana, MCF-10A, através da função de distribuição de agregados celulares, e observaram que uma transição fenotípica no regime de crescimento ocorria nas células cancerosas dependentes de estrógeno, as MCF-7 (Figura 3). A transição observada foi de uma distribuição em leis de potência para um decaimento exponencial. Dessa forma, inicialmente, os agregados são compactos e bem delineados, sem tamanho característico, e grandes agregados raramente eram observados. Após a transição, os agregados de maior tamanho davam origem a agregados menores e mais numerosos ao longo do tempo. Assim, a dimensão fractal dos agregados de MCF-7, que inicialmente era próxima de 2 ($D_f = 2$), diminuiu, assim como a definição do contorno dos agregados que passaram a apresentar espaços vazios. Essa transição fenotípica foi associada à perda de adesão célula-célula, fato evidenciado pela fragmentação dos agregados após 96 horas do plaqueamento.

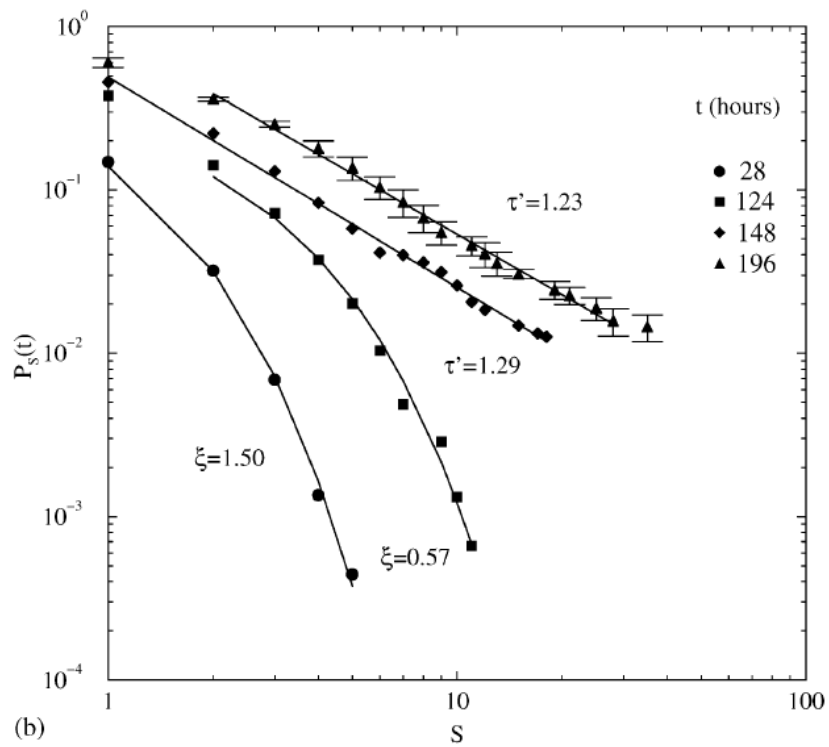
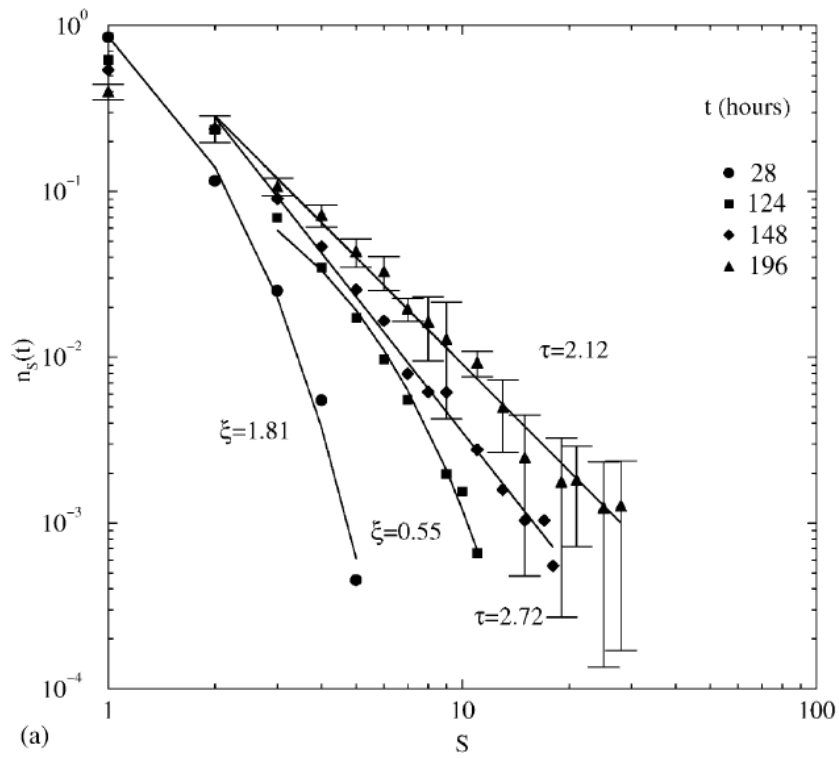


Figura 2 - (a) $n_s(t)$ and (b) $P_s(t)$ para células MDCK cultivadas em monocamada. $n_s(t)$: número de agregados contendo s células em um tempo t ; e $P_s(t)$: probabilidade de em um tempo t observar um agregado com mais de s células. A linha curva representa uma função exponencial, e a linha reta, uma função expressa por leis de potência (MENDES et al., 2001). Observar a transição de linhas curvas para linhas retas.

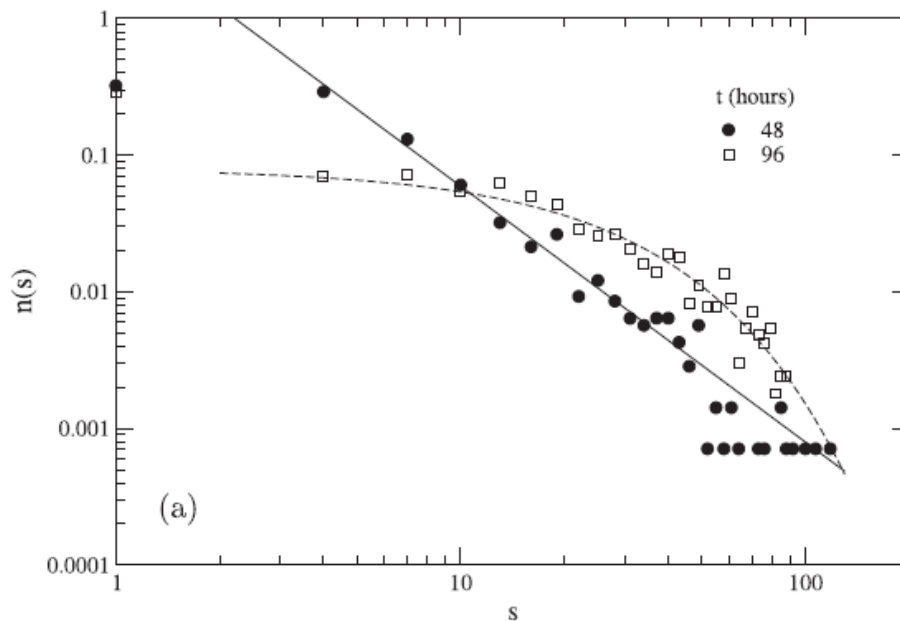


Figura 3 - $n_s(t)$: número de agregados contendo s células MCF-7 em um tempo t . A linha curva representa uma função exponencial, e a linha reta, uma função expressa por leis de potência (VILELA et al., 2007).

Muitos diagnósticos de neoplasias são feitos com base em análises visuais de imagens radiológicas, microscopia e observação de amostras provenientes de biópsias, sem o auxílio de técnicas moleculares. Clínicos normalmente interpretam estas imagens de forma qualitativa através da observação de aspectos anormais, como irregularidades estruturais e altos índices de mitose. Uma alternativa no diagnóstico do câncer é a análise de imagens com o auxílio de computadores. Neste aspecto, pode então ser aplicada a análise fractal de estruturas irregulares tipicamente encontradas no crescimento tumoral (BAISH et al., 2000).

2.3 *Tecido epitelial*

Epitélios são tecidos compostos por células poliédricas justapostas que apresentam pouca substância extracelular entre elas, esta composta, principalmente, de uma fina camada denominada *lâmina basal*, localizada subjacente às células epiteliais (ALBERTS et al., 2004). Essas células apresentam firme adesão entre si por meio de diferentes tipos de junções

intercelulares, o que permite a organização deste tecido como folhetos de revestimento tanto de superfícies corpóreas externas quanto internas, bem como sua organização sob forma de estruturas glandulares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Deste modo, as funções fundamentais dos tecidos epiteliais consistem do revestimento das superfícies, como na própria pele; absorção de moléculas, que pode ser observada no intestino, por exemplo; secreção de substâncias que ocorre nas glândulas; percepção de estímulos, como no neuroepitélio olfatório e gustativo; e ainda contração, das células mioepiteliais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O tecido epitelial, do mesmo modo que outros tecidos corporais, tem sua estrutura mantida por meio do contato entre as células e entre as células e a matriz extracelular. A adesividade celular consiste no mecanismo fundamental da manutenção da arquitetura tridimensional tecidual.

2.3.1 Junções intercelulares

As estruturas de adesão especializadas que ocorrem nos pontos de contato entre as células e entre as células e a matriz extracelular adjacente são denominadas *junções celulares* (Figura 4). Essas estruturas podem ser funcionalmente classificadas como *junções bloqueadoras, comunicantes* ou *de ancoramento* (ALBERTS et al., 2004).

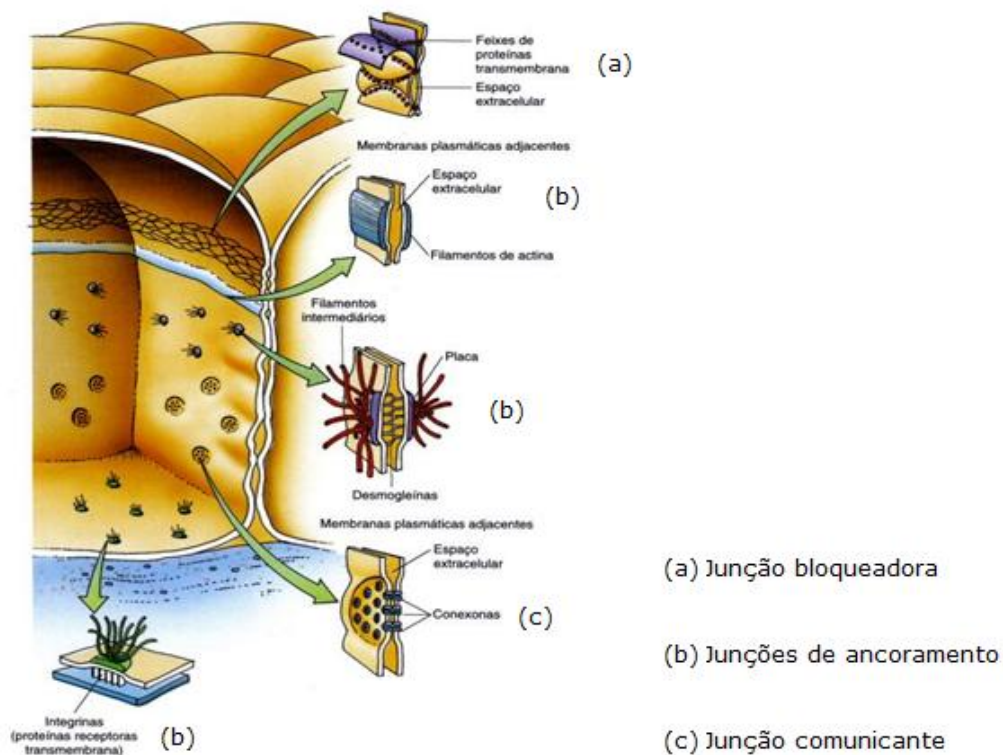


Figura 4 - Esquema demonstrando a organização do tecido epitelial, e destacando as junções intercelulares encontradas.

As junções bloqueadoras conhecidas são as zônulas de oclusão, que impedem a passagem de pequenas moléculas entre as células vizinhas (ALBERTS et al., 2004), formando um cinturão ao redor de todo o ápice da célula pela fusão das membranas adjacentes. Devido à sua função de controle do tráfego paracelular, essas junções são responsáveis pela formação de compartimentos funcionais delimitados por camadas de células epiteliais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Já as junções comunicantes, ou junções 'gap' são mediadoras da passagem tanto de sinais elétricos quanto químicos entre as células em interação, uma vez que possibilitam a passagem de íons orgânicos e pequenas moléculas solúveis em água através de canais formados por proteínas (ALBERTS et al., 2004). Esse tipo de junção pode ser encontrado em qualquer região da membrana lateral das células do epitélio, sendo, ainda, encontrado em praticamente todos os tecidos de

mamíferos, exceto no músculo esquelético e células sanguíneas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; ALBERTS et al., 2004).

As junções de ancoramento, por sua vez, conectam as células vizinhas mecanicamente, bem como estas e a matriz extracelular adjacente, pela interação com o citoesqueleto, e compreendem as zônulas de adesão, hemidesmossomas e desmossomas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Esse tipo de junção é responsável pela manutenção da coesão entre as células teciduais, e é mais abundante em tecidos que estão mais expostos ao estresse mecânico intenso, como músculo cardíaco e epiderme (ALBERTS et al., 2004). As zônulas de adesão circundam toda a célula, formando uma faixa ou cinturão, de modo a possibilitar a inserção de filamentos de actina e a aderência entre as células. Os hemidesmossomas estão presentes em pontos de contato de células epiteliais com a lâmina basal subjacente, realizando a ancoragem entre as duas estruturas por meio de proteínas transmembranas da classe das integrinas que interagem com os filamentos intermediários do citoesqueleto. Já os desmossomas são estruturas em forma de disco que se localizam entre células vizinhas, interagindo, também, com os filamentos intermediários do citoesqueleto de ambas as células, de modo a fornecer grande resistência ao estresse mecânico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

2.4 Desmossomas

Os desmossomas foram inicialmente descritos por PORTER (1956), utilizando microscopia eletrônica, e em seguida por FARQUHAR e PALADE (1963), que conseguiram determinar a ultra-estrutura do desmossoma como sendo parte do complexo juncional existente entre as células epiteliais de vertebrados.

Desmossomas – do grego, ‘desmos’ (ligado, ligação) e ‘soma’ (corpo) – são estruturas intercelulares de adesão altamente especializadas presentes em tecidos epiteliais e músculo cardíaco, que

interagem com os filamentos intermediários do citoesqueleto de células adjacentes, formando uma verdadeira rede interna (Figura 5), e provendo alta resistência ao estresse mecânico a que tais tecidos são submetidos (GREEN & GAUNDRY, 2000; GARROD et al., 2002; YIN & GREEN, 2004; CALKINS et al., 2006; KOTTKE et al., 2006; CHIDGEY & DAWSON, 2007; GARROD & CHIDGEY, 2008; GREEN & SIMPSON, 2007; STOKES, 2007).

2.4.1 Distribuição

Desmossomas são especialmente importantes para a manutenção da integridade de tecidos submetidos a constante estresse físico, encontrando-se, desta forma, amplamente distribuídos nos tecidos epiteliais (CHIDGEY & DAWSON, 2007; GREEN & SIMPSON, 2007; STOKES, 2007). Em alguns tecidos epiteliais, contudo, verificou-se a ausência de desmossomas, como no epitélio pigmentado da retina (DOCHERTY et al., 1984) e epitélio da lente (RAMAEKERS et al., 1983).

Os desmossomas também estão presentes em alguns tecidos não-epiteliais, como no músculo estriado cardíaco (FRANKE ET AL., 1982; STOKES, 2007), em células dendríticas foliculares dos linfonodos (JONES et al., 1986; MONDA et al., 1986; GREEN & GAUNDRY, 2000) e em células aracnoidais e piais das leptomeninges (VILELA et al., 1987; CONN et al., 1990; NILLES et al., 1991; SCHIMIDT et al., 1994; GREEN & GAUNDRY, 2000).

2.4.2 Estrutura e função dos desmossomas

O estudo da composição bioquímica dos desmossomas foi viabilizado a partir do desenvolvimento de uma técnica para o isolamento de tais estruturas a partir do epitélio nasal de bovinos (SKERROW & MATOLTSY, 1974; GORBSKY & STEINBERG, 1981).

Os desmossomas são formados, ultraestruturalmente, por duas placas intracelulares de cerca de 40 nm de espessura, dispostas em paralelo, separadas por um espaço entre as membranas plasmáticas vizinhas de cerca de 30 nm. A placa intracelular é dividida em duas regiões: região próxima à membrana (placa densa externa – ODP, em inglês), com cerca de 20 nm de espessura, e a região mais afastada da membrana (placa densa interna – IDP, em inglês), com menos de 10 nm de espessura (Figura 6) (GARROD & CHIDGEY, 2008). A placa densa externa (ODP) é constituída pelos domínios intracelulares das caderinas desmossômicas, além de duas proteínas da família armadillo, placoglobina e placofilina. A placa densa interna, por sua vez, é composta de desmoplaquina, que atua como sítio de ancoragem para os filamentos intermediários do citoesqueleto (STOKES, 2007).

Os desmossomas são particularmente abundantes nos tecidos submetidos a estresse mecânico intenso, atuando juntamente com os filamentos intermediários aos quais estão acoplados, como uma rede distribuidora da força do estresse físico ao longo dos tecidos em que se encontram (GREEN & SIMPSON, 2007). A importância de seu papel estrutural na manutenção da arquitetura celular e tecidual é reforçada pela existência de doenças da pele e coração nas quais a integridade tecidual é rompida por defeitos genéticos, toxinas bacterianas ou anticorpos auto-ímmunes contra componentes desmossômicos (GREEN & GAUNDRY, 2000; CHENG & KOCH, 2004; GETSIOS et al., 2004).

Assim, em resumo, pode-se atribuir aos desmossomas uma estrutura típica que envolve: a ligação de proteínas de membrana celular de células adjacentes no espaço intercelular, estruturas em forma de placas na face citoplasmática dos sítios de adesão formados pelo arranjo de proteínas que se ligam aos domínios citoplasmáticos das moléculas de adesão intercelular, associação de filamentos intermediários do citoesqueleto com essas placas (HUBER, 2003).

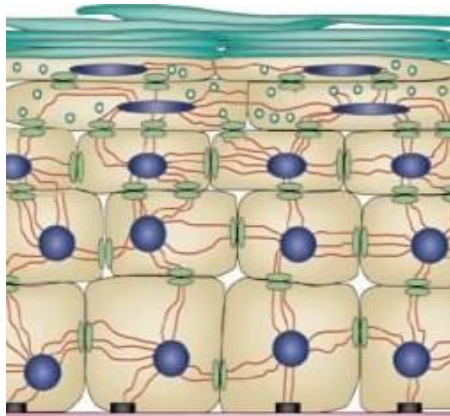


Figura 5 – Representação do tecido epitelial. Note as várias camadas de células, e os desmosomas (placas verdes) existentes entre elas, formando uma rede interna que conecta os filamentos intermediários (vermelho). Modificado de Elisson & Garrod (1984).

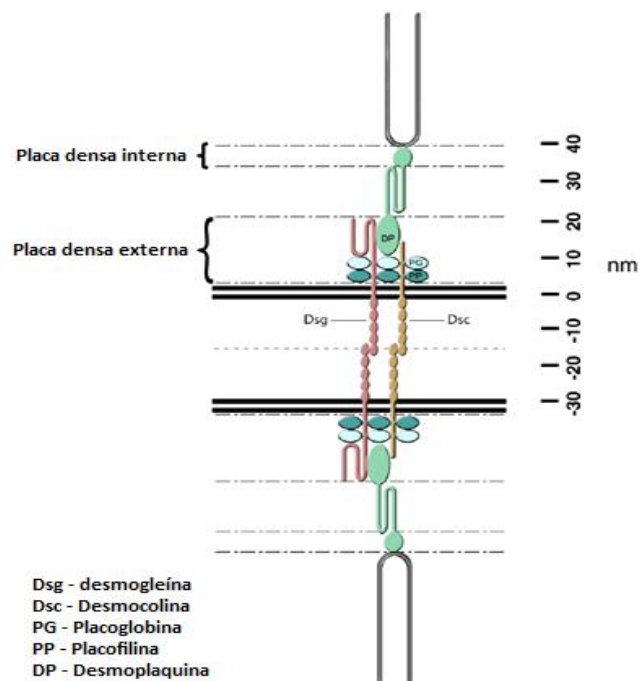


Figura 6 – Modelo esquemático de um desmosoma, mostrando as posições relativas dos principais componentes desmosômicos. A escala à direita indica a distância em nanômetros. (Modificado de Garrod & Chidgey, 2008)

2.4.3 Proteínas desmosômicas

As proteínas desmosômicas são, basicamente, de três famílias de genes: proteínas armadillo, plaquinas e caderinas (Figura 7).

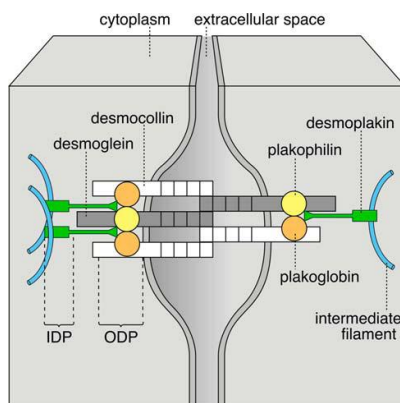


Figura 7 – Modelo esquemático de um desmosoma, representando as interações existentes entre suas proteínas constituintes (WASCHKE, 2008). IDP = Inner dense plaque; ODP = Outer dense plaque.

As proteínas da família armadillo incluem a placoglobina (γ -catenina) e placofilinas. A placoglobina, uma proteína citoplasmática, possui sítios de ligação que interagem com caderinas desmossômicas, placofilinas e desmoplaquina (família das plaquinas), podendo ser encontrada tanto em desmossomas quanto em zônulas de adesão. Além de seu papel estrutural, a placoglobina pode atuar como molécula sinalizadora, atuando na via Wnt/ β -catenina (CHIDGEY & DAWSON, 2007). Existem três isoformas de placofilinas (Pkp1-3), as quais apresentam complexos padrões de expressão tecidual e podem ser localizadas no desmossoma e no núcleo. A família das plaquinas, por sua vez, inclui uma proteína obrigatória para a adesividade do desmossoma, a desmoplaquina, e outras proteínas que não são indispensáveis para a adesão, como plectina, envoplaquina, e periplaquina, mas que também se localizam no desmossoma. A desmoplaquina se apresenta sob duas isoformas diferenciadas, geradas por 'splicing' alternativo (GETSIOS et al., 2004), sendo esta a proteína que atua como ligante entre os filamentos intermediários e a placa desmossômica (GARROD & CHIDGEY, 2008). Já as caderinas desmossômicas são as moléculas que atravessam a membrana plasmática e acoplam as duas metades do desmossoma no espaço intercelular. Essa família de proteínas inclui as desmocolininas, as quais são encontradas sob três diferentes isoformas (Dsc1-3), e as desmogleínas, presentes em quatro isoformas (Dsg1-4). Todos os desmossomas possuem pelo menos uma desmocolina e uma desmogleína, de modo que ambas são necessárias para a adesão (CHIDGEY & DAWSON, 2007; DUSEK et al., 2007). Os níveis de expressão das várias isoformas das proteínas desmossômicas, contudo, varia de acordo com o tipo celular, e com a camada tecidual em que são encontradas (GREEN & GAUNDRY, 2000; GARROD et al., 2002; GETSIOS et al., 2004; DUSEK et al., 2007; GREEN & SIMPSON, 2007).

Na placa desmossômica, as caderinas desmossômicas formam a interface adesiva dos desmossomos, enquanto as proteínas das famílias armadillo e das plaquinas formam as placas. Acredita-se que a cauda

citoplasmática das Dsgs e Dscs interage com a placoglobina, a qual, por sua vez, se liga à desmoplaquina. Finalmente, a desmoplaquina ancora os filamentos intermediários do citoesqueleto (WASCHKE, 2008). Essas interações parecem ser estabilizadas lateralmente pelas placofilinas (HATZFELD, 2007).

2.5 Caderinas

Segundo Alberts et al. (2004), as caderinas são as principais moléculas de adesão celular nos tecidos dos vertebrados. As caderinas constituem uma grande família de proteínas cálcio-dependente que exercem função primordial no desenvolvimento e morfogênese dos tecidos. Em organismos adultos, as interações entre caderinas de células vizinhas mantêm a integridade estrutural dos tecidos sólidos e regula a conversão e reorganização de estruturas teciduais (GUMBINER, 1996; GUMBINER, 2005). Durante o desenvolvimento, as caderinas são responsáveis pelo direcionamento da segregação celular e formação de interfaces teciduais distintas (LECKBAND & PRAKASAM, 2006).

As primeiras caderinas a serem conhecidas foram denominadas de acordo com os principais tecidos nos quais são encontradas – E-caderina (tecido epitelial), N-caderina (células nervosas, musculares e da lente ocular), e P-caderina (placenta e epiderme) – embora também tenham sido encontradas em outros tecidos, como a E-caderina, por exemplo, que também está presente em algumas partes do cérebro. Essas e outras *caderinas clássicas* se relacionam pela seqüência de seus domínios intra e extracelulares. Existe, ainda, um vasto número de *caderinas não-clássicas*, que incluem as proteínas com função de adesão, como as caderinas desmossômicas, além de outras proteínas que aparentemente não apresentam função de adesão, como a T-caderina, que não possui o domínio transmembrana e se liga à membrana plasmática de células nervosas e musculares por um grupamento glicosilfosfatidilinositol. As

demais caderinas são glicoproteínas que atravessam a membrana somente uma vez, e que apresentam um domínio extracelular de ~110 aminoácidos envolvidos em adesão e ligação ao cálcio (DUSEK et al., 2007). As variações no domínio citoplasmático dessas proteínas parecem determinar sua especificidade funcional, conferindo-lhes habilidade de interagir com outras proteínas. A parte extracelular da cadeia de polipeptídeos geralmente se apresenta dobrada em 5 ou 6 repetições de caderinas, as quais se relacionam estruturalmente às imunoglobulinas (Ig).

A análise da estrutura cristalina das caderinas clássicas E- e N-caderina auxiliaram no entendimento da importância da ligação do Ca^{2+} para a função das caderinas em geral. Os íons de Ca^{2+} se posicionam entre cada par de repetições de caderina, de modo a fazer com que essas repetições formem uma estrutura firme em forma de haste, em que quanto mais íons de Ca^{2+} se ligam, mais rígida se torna. Se o cálcio for removido, a parte extracelular da proteína se torna flexível e é rapidamente degradada por enzimas proteolíticas.

As caderinas também atuam como moléculas de sinalização que influenciam a diferenciação e movimentação celular, além da organização tecidual já mencionada. Culturas de células sobre substratos de caderina são utilizadas para estimular funções teciduais específicas em tecidos projetados. Hepatócitos cultivados em substratos revestidos com caderina epitelial solúvel recombinante aprimoraram funções hepáticas específicas e a diferenciação celular (SEMLER et al., 2005a; SEMLER et al., 2005b; BREIVA & MOGHE, 2004).

As caderinas estão presentes tanto nos vertebrados quanto em invertebrados, de modo que aparentemente todas as células de vertebrados apresentam pelo menos uma caderina, de acordo com o tipo celular em questão. Elas são as principais responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos embrionários, hipótese sustentada por experimentos realizados envolvendo cultura de células embrionárias com depleção de Ca^{2+} extracelular, ou tratamento com anticorpos anti-

caderina, em que há a ruptura dos tecidos. Ademais, mutações que causem a inativação da E-caderina levam embriões de camundongos à morte no início do desenvolvimento. Ainda, as caderinas, que são, assim, classicamente caracterizadas como moléculas de adesão, também apresentam indícios de atuação na regulação de processos tais como a própria embriogênese, destino de células tronco e sua manutenção, tumorigênese, polaridade celular, transdução de sinais e apoptose (DUSEK et al., 2006; DUSEK et al., 2007).

2.5.1 Caderinas clássicas

As caderinas clássicas são as proteínas dessa superfamília que possuem mecanismo e funções mais bem desvendados no contexto do desenvolvimento animal. A característica peculiar deste grupo é a presença de domínio intracelular conservado, o qual media a interação dessas caderinas com um grupo de proteínas citoplasmáticas denominadas cateninas. Levando-se em conta a organização de seu domínio extracelular, as caderinas clássicas podem ser divididas em três sub-tipos. Os domínios extracelulares das caderinas tipo I e II são constituídos por 5 repetições de caderinas, sendo que estes dois subtipos parecem ser exclusivos dos vertebrados. As caderinas do tipo III possuem um número variável de repetições de caderina, e também apresentam uma região denominada domínio primitivo clássico de caderina, o qual em conjunto com um variado número de repetições dos tipos EGF e laminina G, se posiciona entre as repetições de caderina e a hélice transmembrana. As caderinas do tipo III são encontradas tanto em vertebrados quanto em invertebrados (ODA et al., 2002; TANABE et al., 2004), mas não estão presentes em mamíferos.

O domínio intracelular das caderinas clássicas é o sítio de organização de um complexo macromolecular que promove a ligação entre a interface de adesão e a actina do citoesqueleto. Duas proteínas são relacionadas à essa atividade, as α - e β -cateninas. As β -cateninas se

ligam ao C-terminal do domínio intracelular da caderina bem como ao N-terminal da α -catenina. A α -catenina se liga a várias proteínas envolvidas na ligação, empacotamento e polimerização da actina, além de se ligar diretamente à própria F-actina. A ausência de α - e β -catenina resulta em adesão celular defeituosa. Uma terceira proteína, p120 catenina, se liga ao domínio intracelular das caderinas clássicas em um sítio distinto da β -catenina. Assim, as caderinas clássicas, em conjunto com as três cateninas, formam uma estrutura funcional central, a qual constitui o principal componente das junções intercelulares apicais formadas entre as células epiteliais (PETTITT, 2005).

2.5.2 Caderinas desmossômicas

A família das caderinas desmossômicas – glicoproteínas integrais de membrana do tipo I – é constituída por 4 isoformas de desmogleínas (Dsg1-4) e três isoformas de desmocolina (Dsc1-3), sendo cada um produto de genes distintos, as subfamílias *DSG* e *DSC* estando agrupadas em lados opostos de uma região central do cromossomo 18 (GETSIOS et al., 2004). A organização genômica é semelhante à das caderinas clássicas, fato que evidencia uma possível evolução a partir de um ancestral comum através de duplicação gênica múltipla e eventos evolutivos divergentes (DUSEK et al., 2007). Desmocolinas e desmogleínas apresentam 30% de identidade de aminoácidos entre si e com as caderinas clássicas (GARROD et al., 2002). Cada um dos três genes da desmocolina codifica um par de proteínas geradas por splicing alternativo, uma forma 'a' mais longa e uma forma 'b' mais curta, que diferem somente por causa de sua extremidade C-terminal. Os domínios extracelulares da desmogleína e da desmocolina são altamente homólogos aos da E-caderina, protótipo de caderina tipo I (cerca de 50-56% de similaridade), sendo formados por quatro domínios do tipo caderina (EC), cada um de cerca de 110 aminoácidos, contendo ainda um sítio de ligação para o cálcio e uma âncora extracelular (EA), mais

próxima da membrana e menos relacionada aos anteriores. Dentro da célula, a desmogleína possui uma âncora intracelular (IA) e uma seqüência do tipo caderina (ICS), assim como a Dsc 'a'. A forma 'b' da desmocolina, mais curta, não apresenta a seqüência intracelular do tipo caderina (ICS), terminando em 11 resíduos que não são encontrados na forma 'a' da desmocolina (DUSEK et al., 2007). O domínio ICS das caderinas desmossômicas fornece substrato para interação com outras proteínas dessa junção intercelular, como a proteína da família armadillo placoglobina (Figura 8) (GARROD & CHIDGEY, 2008).

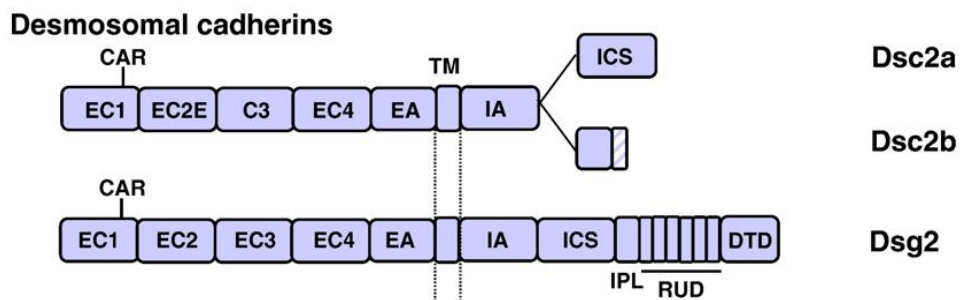


Figura 8 – Caderinas desmossômicas. EC1-4: repetições extracelulares de caderina; EA: âncora extracelular; TM: transmembrana; IA: âncora intracelular; ICS: seqüência intracelular do tipo caderina; IPL: ligante intracelular rico em prolina; RUD: domínio de unidade de repetição; DTD: domínio terminal da desmogleína. Note que o diagrama não está em escala (GARROD & CHIDGEY, 2008).

As caderinas desmossômicas são responsáveis pela formação da interface de adesão entre as células adjacentes. As interações existentes entre as caderinas nas diferentes estruturas de adesão celular podem ser homotípicas (ou homofílicas), ocorrendo entre caderinas do mesmo tipo, ou ainda heterotípicas (ou heterofílicas), que ocorrem entre diferentes tipos de caderinas. Nose e colaboradores (1988) indicam a prevalência de interações homofílicas entre caderinas clássicas existentes nas zônulas de adesão, outro tipo de junção de ancoramento mencionado anteriormente. Estudos posteriores também sustentam esse resultado (INUZUKA et al., 1991; MURPHY-ERDOSH et al., 1995; PATEL et al., 2006). As caderinas desmossômicas, no entanto, parecem apresentar os

dois tipos de interação, ou seja, há adesão entre caderinas do mesmo tipo, bem como entre caderinas diferentes (adesão homo e heterotípica).

Syed e colaboradores (2002) realizaram experimentos que indicaram não só a existências de ambos os tipos de associação entre as caderinas, como também demonstraram que em alguns casos, as interações homotípicas podem ser significativamente menos resistentes que as heterotípicas, e ainda que este segundo tipo de interação existente entre as caderinas desmossômicas é dependente de Ca^{2+} . Tselepis e colaboradores (1998) também ressaltam a importância da presença de ambas as classes de caderinas desmossômicas para a adesão celular eficiente, durante estudos da influência de desmossomos sobre a invasividade.

Getsios et al. (2004) relatam a presença de interações *cis* e *trans* entre as caderinas desmossômicas (ambas representadas na Figura 9 abaixo). As interações do tipo *cis* são as que ocorrem entre caderinas presentes na superfície da mesma célula, com a formação de dímeros paralelos, enquanto as interações *trans* envolvem moléculas de caderinas antiparalelas de células opostas (SYED et al., 2002). Ambos os tipos de associação ocorrem a partir de sítios específicos presentes no domínio EC1 das caderinas, envolvendo resíduos altamente conservados do aminoácido triptofano ali localizados (AL-AMOUNDI et al., 2007). As moléculas de caderina adotam uma conformação curvada, estável, em que o triptofano de uma molécula interage com o domínio EC1 da outra caderina, formando uma ligação flexível, tanto nas interações *cis* quanto *trans* (GETSIOS et al., 2004; HE et al., 2003; GARROD & CHIDGEY, 2008).

A proporção relativa entre desmogleínas e desmocolinas presentes nos desmossomos parece ser determinantes para a adequada adesão (GETSIOS et al., 2004a). No entanto, Ishii e colaboradores (2001) demonstraram que a organização desmossômica tolera relativamente bem variações estequiométricas das caderinas endógenas, sendo que no caso da introdução de isoformas ectópicas, estas não somente não são

incorporadas aos desmossomas, como também podem levar à sua desorganização.

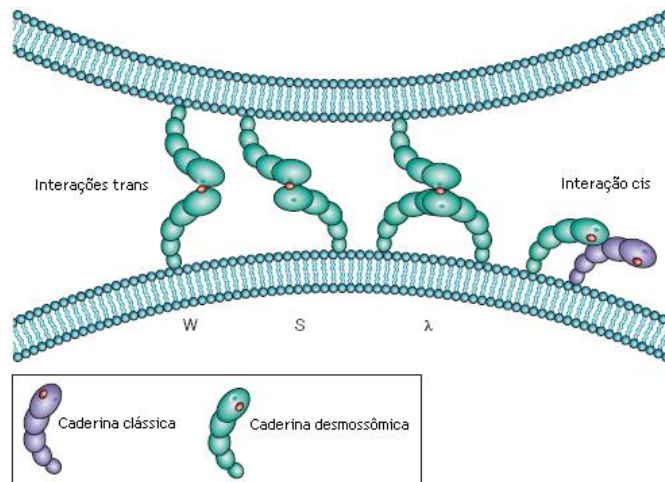


Figura 9 - Modelo estrutural para as interações entre as caderinas na superfície celular. As interações *trans* permitem que as moléculas de células adjacentes se conectem, e as interações *cis* formam dímeros laterais na superfície da mesma célula. A presença de um resíduo triptofano (em vermelho) conservado no domínio EC1 permite a formação dessas interações. Modificado de Getsios et al., 2004.

As caderinas desmossômicas exibem padrões de expressão específicos variando de acordo com o tipo de tecido. Dsc2 e Dsg2, especificamente, são encontradas em todos os tecidos que apresentam desmossomos, enquanto as outras isoformas, ao contrário, são altamente específicas a tecidos epiteliais estratificados (GARROD et al., 2002; DUSEK et al., 2007). A expressão diferenciada das isoformas de desmocolina e desmogleína, no entanto, se sobrepõem, de modo que mais de uma isoforma pode ser encontrada no mesmo desmossomo. As proteínas '2' e '3' são abundantes nas camadas inferiores, e as proteínas '1' e a Dsg4, nas camadas superiores.

2.6 Desmogleína

2.6.1 Estrutura e funções

Segundo Dusek et al. (2007), as desmogleínas apresentam caudas citoplasmáticas contendo subdomínios adicionais, peculiares destas

proteínas, não sendo encontrados nas demais caderinas. Um segmento conector rico em prolina (IPL) é encontrado antes em posição intracelular em relação a ICS, tendo ainda como seqüência adjacente um domínio de unidades repetidas (RUD), de 29 ± 1 resíduos repetidos. Cada isoforma diferente da desmogleína apresenta repetições variadas nesse domínio, Dsg1 com 5 repetições, Dsg2 com seis, 2 na Dsg3 e 3 na Dsg4. A função do domínio RUD ainda não está esclarecida, contudo, um estudo sugere que essa região possa exercer um papel na homodimerização da cauda da Dsg1 (RUTMAN et al., 1994). Adjacente ao domínio RUD, encontra-se um domínio terminal rico em glicina (DTD), cuja função também permanece obscura, até o presente.

2.6.2 Desmogleína e o câncer

Vários estudos vêm sendo realizados estabelecendo relações entre a expressão de isoformas de proteínas e a presença de tumores e outros distúrbios de crescimento de diferenciação celular, identificando situações de possível estímulo à proliferação das células ou o efeito contrário. Os resultados até então encontrados apresentam variações bastante significativas, fato que provavelmente se deve à presença de diferentes isoformas de desmogleína bem como à análise de diferentes tipos de câncer.

Em 2001, Hunt e sua equipe relataram que pacientes com haploinsuficiência (deficiência monoalélica) de Dsg1 apresentavam a pele das palmas das mãos e solas dos pés espessadas, possivelmente como resultado da adesão defeituosa e alterações compensatórias na proliferação e diferenciação dos queratinócitos, ou seja, foi identificada uma relação entre o desbalanço de Dsg1 e o estímulo da proliferação de queratinócitos.

Outros pesquisadores analisaram a expressão de Dsg2, e identificaram a redução desta proteína em câncer gástrico, e relataram ainda que não identificaram mutações preponderantes no gene da Dsg2

(BIEDERMANN et al., 2005), enquanto no caso de carcinoma de célula escamosa, na pele, Kurzen e colaboradores (2003) encontraram um aumento qualitativo da mesma proteína em metade de todas as neoplasias examinadas. Além disso, o número de células positivas para Dsg 2 foi significativamente maior nas amostras de carcinoma de célula escamosa de alto risco do que nas de baixo risco, sendo que dentre as análises realizadas pelo grupo, somente a Dsg2 apresentou correlação com o risco de metástase. No caso da superexpressão de Dsg2 em camadas suprabasais da epiderme de camundongos, observou-se uma hiperproliferação de queratinócitos e o aparecimento de papilomas pré-cancerosos na pele dos animais transgênicos (BRENNAN et al., 2007).

Chen e sua equipe (2007) identificaram a expressão significativamente aumentada da isoforma Dsg3 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Em suas pesquisas, foi demonstrado, ainda, que a inibição da Dsg3 por RNA de interferência (RNAi) reduziu significativamente o crescimento celular e a formação de colônias em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço, além de também reduzir a migração celular, diminuindo a capacidade invasiva. Em camundongos BALB/C, a inibição da Dsg3 levou à redução da taxa de crescimento tumoral.

Recentemente, Schmitt e seus colaboradores (2007) identificaram a presença da Dsg2 em linhagens de melanoma. A desmogleína não havia sido, até então, demonstrada em melanoma. Curiosamente, das proteínas desmossômicas, esta foi a única encontrada pelos pesquisadores, de modo que seu papel pode estar relacionado aos mecanismos de controle do crescimento celular. Uma relação foi estabelecida entre a presença da isoforma 2 da desmogleína e a formação de metástase pelo melanoma.

Assim, pode-se observar que há uma relação entre os níveis de expressão da caderina desmossômica desmogleína e diferentes fatores relacionados ao crescimento e diferenciação celular, especialmente no que se refere ao processo de formação de tumores.

Até o presente momento, não foram encontrados relatos de pesquisas que relacionem a expressão da desmogleína aos padrões de crescimento de linhagens celulares epiteliais. Deste modo, o objetivo geral do presente estudo consistiu em relacionar os níveis de expressão da desmogleína à transição fenotípica de crescimento identificada anteriormente nas linhagens celulares epiteliais utilizadas neste experimento, comparando entre si os resultados obtidos para a linhagem de células normais, MDCK, e das células derivadas de tumor de mama humana, MCF-7.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Estabelecer uma relação entre os níveis de expressão da proteína desmossômica desmogleína e uma transição fenotípica do padrão de crescimento identificada em linhagens celulares *in vitro*, por meio de análises por *western blotting* e imunofluorescência.

3.2 *Objetivos específicos*

1. Realizar *western blotting* das amostras de proteínas obtidas a partir das células MDCK e MCF-7 antes e após a transição fenotípica de crescimento identificada por Vilela e Martins (1995) e descrita nestas linhagens celulares por Mendes et al (2001), Vilela et al. (2003), e Vilela et al. (2007), utilizando o anticorpo anti-desmogleína 32-2B (Vilela et al., 1989), e identificar as possíveis variações de expressão da proteína.
2. Proceder à imunofluorescência das linhagens celulares em estudo, nos mesmo tempos antes e após a transição fenotípica, comparando as imagens obtidas com os resultados do *western blot*, usando o anticorpo monoclonal 11-5F (PARRISH et al. 1987).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

4.1.1 Descrição das linhagens celulares

4.1.1.1 MDCK

Linhagem de células epiteliais normais derivadas do rim de cão, inicialmente estabelecida por Madin e Darby, em 1958. As células utilizadas neste experimento foram disponibilizadas pelo Laboratório do Câncer (Universidade Federal de Viçosa, MG).

4.1.1.2 MCF-7

Linhagem de células de tumor de mama humana, dependente de estrógeno, inicialmente estabelecida a partir de efusão pleural de uma paciente com metástase, em 1973 (SOULE et al., 1973). As células utilizadas neste experimento estavam disponíveis no Laboratório do Câncer (Universidade Federal de Viçosa, MG), e foram adquiridas no Banco de Células (Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ).

4.1.2 Procedimentos básicos de cultura de células

As linhagens celulares foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura completo (“Dulbecco’s Modified Eagles Medium” - DMEM - suplementado com 10% de soro fetal bovino e glutamina 2 mM/mL), em frascos de cultura de 25 ou 75 cm², de poliestireno, em incubadora mantida a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Quando as culturas atingiam a subconfluência, as células eram, então, tripsinizadas,

replaqueadas e mantidas em estufa, sob as mesmas condições descritas acima. As culturas eram periodicamente observadas em microscópio de luz invertido.

4.1.2.1 Tripsinização

Culturas de células subconfluentes, após o descarte do meio de cultura, foram lavadas três vezes com PBS e incubadas a 37°C com solução de tripsina a 0,25% e 0,05% de EDTA até que, sob observação microscópica, fosse detectada a dissociação das células entre si, e delas com o substrato. A reação de tripsinização era interrompida pela adição de 5,0 mL de meio completo. A suspensão celular era então coletada em tubo de centrífuga e centrifugada a 1500 r.p.m., por 5 minutos, à temperatura ambiente. O meio sobrenadante era cuidadosamente descartado e as células ressuspendidas em meio completo. Após efetuar a contagem celular, com teste de viabilidade, volumes da suspensão celular foram subcultivadas contendo o número desejado de células.

4.1.2.2 Contagem do número de células viáveis

As contagens das células viáveis foram efetuadas em hemocitômetro de Neubauer (Figura 10), após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular, obtida por meio da tripsinização da cultura celular desejada.

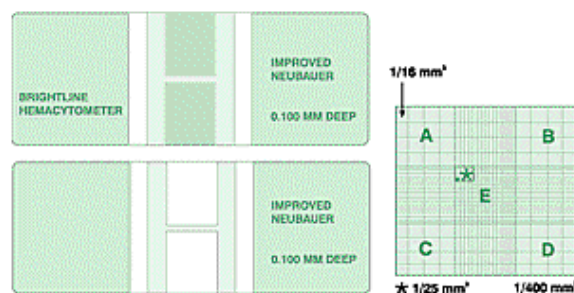


Figura 10 – Câmara de Neubauer

Para a determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripán a 0,1 % (diluição 1:1), por dez minutos a 37°C. Células hípidas excluem o corante. Para o cálculo da percentagem de células viáveis utilizou-se a fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Para determinação da quantidade de células viáveis por cm³ ou mililitro, calculou-se a média aritmética entre o número de células vivas das duas câmaras. O número encontrado era então multiplicado por 10⁴ e pelo valor de diluição (caso houvesse). Foram contadas somente as células que se encontravam ao menos parcialmente na parte central da câmara de Neubauer.

4.1.2.3 Criopreservação

Quando necessário, alíquotas de células eram congeladas após tripsinização rotineira de culturas semiconfluentes. A interrupção da reação de tripsinização era realizada com adição de meio completo e lavagem das células por centrifugação (1500 r.p.m.). As células foram, então, ressuspensas em meio completo contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e as suspensões celulares acondicionadas em criotubos de até 1,8 mL, que permaneciam durante a noite a - 80°C sendo posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (-196° C), onde foram armazenados até que fosse necessário seu descongelamento.

4.1.2.4 Descongelamento

Para o descongelamento, criotubos com células da linhagem celular de interesse eram mantidos a 37°C, durante 5 minutos. A suspensão celular era então lavada com 10 mL de meio completo por centrifugação a 1500 r.p.m. durante 3 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção do DMSO utilizado no congelamento. As células foram ressuspensas em meio completo, após descarte do sobrenadante, e subcultivadas em frasco de cultura de 25 cm².

4.2 Protocolo dos experimentos

4.2.1 Plaqueamento das células

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi de se obter uma distribuição celular que no tempo inicial fosse constituída por células isoladas e, da melhor maneira possível, dispersas na garrafa de cultura. Desta forma, com base em experimentos realizados anteriormente, as células foram plaqueadas a uma densidade de 10 células/mm² em garrafas de cultura de 175 cm², visando obter um número suficiente de células para que fosse realizada a eletroforese. As células foram incubadas com meio DMEM completo com soro fetal bovino (SFB), e as garrafas foram mantidas em estufa, à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

Segundo estudos realizados anteriormente (MENDES et al., 2001; VILELA et al., 2003), os tempos ideais de amostragem das células MDCK, para que fossem obtidas amostras antes da transição fenotípica do padrão de crescimento eram antes de 76 horas em cultura, e para as amostras após a transição, 146 horas. Já para as células MCF-7, os tempos obtidos foram diferentes, sendo 64h e 140h, para as amostras das células antes e após a transição, respectivamente (VILELA et al., 2007).

Nos tempos de amostragem supracitados, as garrafas de cultura foram retiradas da estufa, e as células foram tripsinizadas de acordo com procedimento padrão descrito anteriormente, e a contagem de células totais realizada com hemocitômetro de Neubauer, para se proceder então, ao preparo de amostras para a eletroforese em géis de poliacrilamida.

4.2.2 Caracterização das linhagens celulares

O perfil protéico das linhagens celulares utilizadas neste trabalho foi analisado por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida de uma dimensão com concentração de 8% (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada por cerca de 1 hora e 20 minutos, a 200 volts e 4°C, para dois mini-géis.

4.2.3 Preparo das amostras de proteínas para eletroforese

As células MDCK e MCF-7 utilizadas neste estudo foram cultivadas em garrafas de cultura de 175 cm², e amostras de MDCK foram retiradas antes de 76 horas e após 146 horas, e amostras de MCF-7 foram retiradas antes de 64 horas e após 140 horas, a fim de que fossem obtidas amostras de proteínas para eletroforese antes e depois da transição do padrão de crescimento já identificada em ambas linhagens utilizadas no presente trabalho, entre os respectivos intervalos de tempo supracitados.

Para preparação das amostras para eletroforese de 1D, nos tempos pré-determinados, o meio de cultura foi removido, e as células foram tripsinizadas. Após a tripsinização, as células foram lavadas duas vezes com PBS por centrifugação a 1.500 rpm, durante 3 a 5 minutos. As células eram então ressuspensas em PBS novo, e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, as alíquotas de suspensão celular foram separadas em eppendorfs contendo o número de células pré-determinado para que fosse realizada a eletroforese (5×10^5 células para cada

canaleta do gel), sendo então adicionados 50 µL de tampão de amostra de Laemli (DTT 0,2g; SDS 0,25g; Tris HCl 1M pH 6,8 1,0 mL; azul de bromofenol 2% em etanol 75 µL; glicerol 1,25mL; ressuspender em 12,5 mL de H₂O destilada) em ebulição em cada eppendorf. Em seguida, as amostras foram ressuspensas vigorosamente no tampão em ebulição, causando o desprendimento e solubilização das células, devidamente identificadas e estocadas a -20°C. Imediatamente antes do uso, as amostras foram descongeladas, fervidas durante 5 minutos e centrifugadas em microcentrífuga a 10.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente.

4.2.4 Eletroforese (SDS-PAGE) e eletrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose (*Western blotting*)

Para a eletroforese unidimensional, foram utilizados mini-géis de poliacrilamida, na concentração de 8% de acrilamida. Em cada cavidade do gel de poliacrilamida foram aplicados 5×10^5 células, em 50 µL de tampão. Para isso utilizou-se o sistema vertical de mini-géis da Bio Rad® (Figura 11) e as condições de corrida foram 200V, a 4°C, em um tempo aproximado de 1 hora e 20 minutos, para dois mini-géis.

Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e, no tempo denominado tempo zero, imerso em tampão de renaturação (Tris 10mM; NaCl 50mM; uréia 4M; DTT 0,3 g; H₂O_{dd} 200 mL; pH 7.0) por uma hora. Após 20 minutos, um pedaço de papel de nitrocelulose pouco maior que o mini-gel foi imerso em água destilada. Aos 50 minutos, o papel de nitrocelulose, dois pedaços de papel filtro e duas esponjas foram imersas em tampão de transferência (Tris 20mM; glicina 192 mM; metanol 800 mL; completar para 4L em H₂O_{dd}; pH 8.3). Após uma hora no tampão de renaturação, o gel foi colocado em tampão de transferência por mais 20 minutos. Foram organizados, então, em uma bandeja contendo tampão de transferência, com auxílio de um “cassete” para manter todos os componentes na seguinte ordem: uma esponja, um

pedaço de papel filtro, um pedaço de nitrocelulose (que seria colocado próximo ao anodo), o gel contendo as proteínas de interesse, um pedaço de papel filtro e uma esponja, fechando-se o “cassete” (Figura 11). Os componentes foram colocados cuidadosamente a fim de se evitar a formação de bolhas entre eles. O “cassete” de acrílico foi, então, colocado em uma cuba de acrílico contendo tampão de transferência, e as proteínas foram eletrotransferidas por 48 horas, a 50 volts e 4°C. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi retirada e a presença da desmogleína revelada com anticorpos monoclonais.

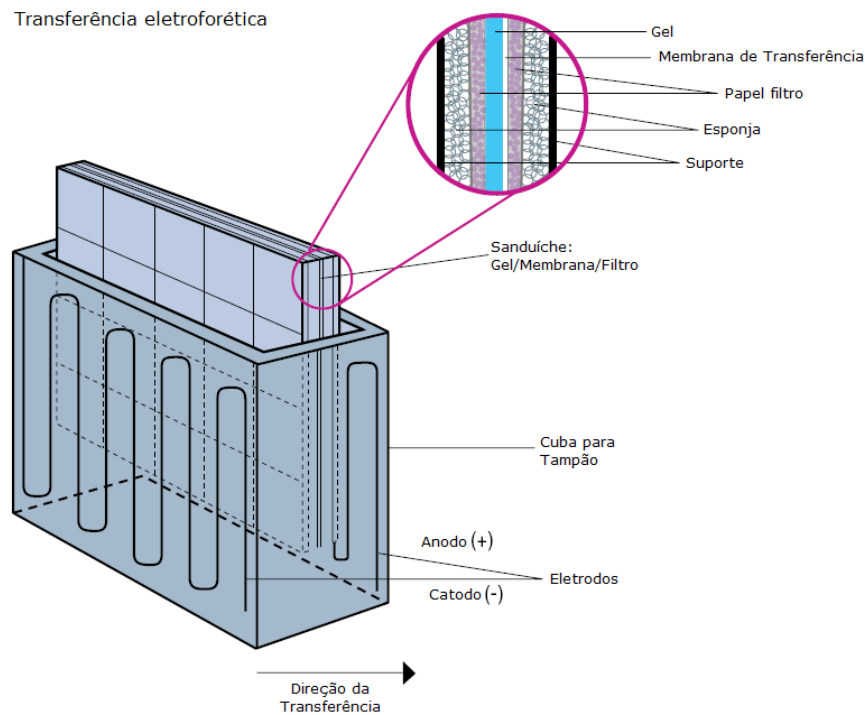


Figura 11 – Esquema demonstrativo indicando a organização do material (ver detalhe) para realização de transferência eletroforética (www.piercenet.com).

4.2.5 Anticorpos monoclonais

Foram utilizados os anticorpos monoclonais 32-2B (IgG2a), específico contra a glicoproteína desmossômica desmogleína, desenvolvidos por VILELA et al. (1987) e o anticorpo monoclonal 11-5F

específico para desmoplaquina I e II (PARRISH et al., 1987). O anticorpo 32-2B foi obtido por meio de uma mistura de isoformas de desmogleína, purificada a partir de epiderme nasal bovina, de modo que pertence à classe IgA e reconhece principalmente as isoformas 1 e 3 de Dsg (VILELA et al., 1995).

4.2.6 Revelação pelo método do complexo Avidina - Biotina

Após a transferência, a nitrocelulose foi colocada em tampão de bloqueio (NaCl 150 mM; Tris 10 mM; albumina bovina 1,5 g; H₂O_{dd} 50 mL; pH 7.4) por duas horas a temperatura ambiente, sendo, em seguida, incubada em tampão de anticorpo (NaCl 150 mM; Tris 10 mM; gelatina 0,25 g; Tween 20 0,5 mL; H₂O_{dd} 100 mL; pH 7.4) overnight, a 4°C. A nitrocelulose foi, então, lavada em TBS-Tween (NaCl 8,0g; Tris 0,605 g; HCl 1N 3,8 mL; Tween 20 1,0 mL; H₂O_{dd} 1L; pH 7.6) cinco vezes, com duração de cinco minutos cada lavagem, à temperatura ambiente. Procedeu-se à incubação das tiras de nitrocelulose com os anticorpos monoclonais 32-2B e 33-3D (diluição de 1:5 em tampão de anticorpo) durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante. Após a incubação e lavagem em TBS-Tween, as tiras de nitrocelulose foram incubadas com anti-imunoglobulina de camundongo biotilada (DAKOPATTS®) na diluição de 1:500 em tampão de anticorpo, durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após a lavagem em TBS-Tween, seguiu-se a incubação com o complexo avidina-biotina (10 µL de solução A; 10 µL de solução B; 980 µL de TBS; deixar a solução em repouso por 1h; acrescentar 49 mL de TBS antes do uso) por 1 hora, à temperatura ambiente. Seguiu-se à lavagem da nitrocelulose com TBS-Tween e revelação com solução de DAB (DAKOPATTS®). Após a reação ocorrer, lavou-se a nitrocelulos em TBS e H₂O_{dd}, secando-a em seguida para ser fotografada.

4.2.7 Técnica de Imunofluorescência

As células foram plaqueadas a uma densidade de 10 células/mm², em 2 mL de meio completo, sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro colocadas em placas de 24 poços. As lamínulas de MCF-7 antes da transição foram retiradas antes de 64h em cultura, e após a transição, após 140h. As lamínulas de MDCK foram retiradas antes de 76 h em cultura, e após 146h, para os tempos de amostragem antes e após a transição fenotípica, respectivamente.

Após o período de crescimento celular, as lamínulas foram lavadas em PBS, e em seguida, a cultura foi fixada em metanol gelado por 5 minutos. Logo após, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS, após o que, as lamínulas utilizadas foram colocadas sobre um papel filtro umedecido com H₂O_{dd}, dentro de uma placa de Petri pequena. Sobre cada lamínula, adicionou-se 15 µL do anticorpo primário 11-5F, e incubou-se por 1h, em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as lamínulas foram rapidamente lavadas em PBS, e foram aplicados então 15 µL de IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcada com isotiocianato de fluoresceína diluída 1:20 em PBS sobre cada lamínula. Procedeu-se então a uma nova incubação de 1h, em câmara escura. Após a incubação, as lamínulas foram rapidamente lavadas em água destilada, tendo sido o excesso de água removido com papel absorvente. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com PBS : Glicerol 1:9 ou Vectashield, vedadas com esmalte transparente, e analisadas sob microscópio de fluorescência com comprimento de onda entre 495-280 nm, em um aumento de 1000 x.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo principal estabelecer uma relação entre a expressão da caderina desmossômica desmogleína e os diferentes padrões de crescimento de linhagens de células epiteliais normais e cancerosas, de modo a indicar um possível papel desta caderina desmossômica nas vias de regulação do ciclo celular. Diversos outros estudos têm buscado estabelecer possíveis ações de estimulação ou inibição entre as proteínas desmossômicas e as funções de controle de proliferação celular.

5.1 *Western blot*

Com base nos dados obtidos por Vilela e Martins (comunicado pessoal) e descritos por Mendes *et al.* (2000) e Vilela *et al.* (2007) para as linhagens MDCK e MCF-7, respectivamente, em relação à alteração no padrão de crescimento das células após um tempo estabelecido em cultura em monocamada, as amostras de proteínas das células para a realização do *western blotting* foram retiradas nos tempos de 76 e 146 horas, para a primeira linhagem e 64 e 140 horas para a segunda. Obedecidos os tempos de amostragem, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida, a partir do qual as proteínas obtidas a partir das linhagens estudadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por *western blot*, para marcação com anticorpo específico anti-desmogleína, o 32-2B (VILELA *et al.*, 1987; VILELA *et al.*, 1995).

O resultado do *western blotting* indicou diferenças na expressão da desmogleína entre os tempos de amostragem da mesma linhagem, ou seja, diferenças entre a expressão da desmogleína antes e após a transição, em cada uma das linhagens estudadas. Ademais, comparando-se os níveis de expressão da proteína entre as linhagens estudadas, MDCK e MCF-7, foi observada uma diferença bastante notável entre uma linhagem e a outra (Figura 13).

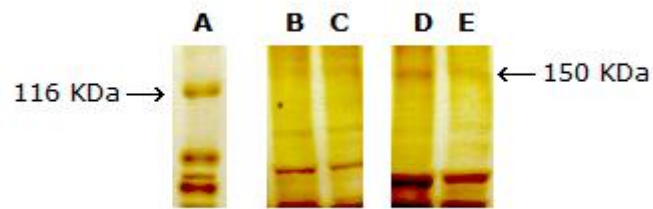
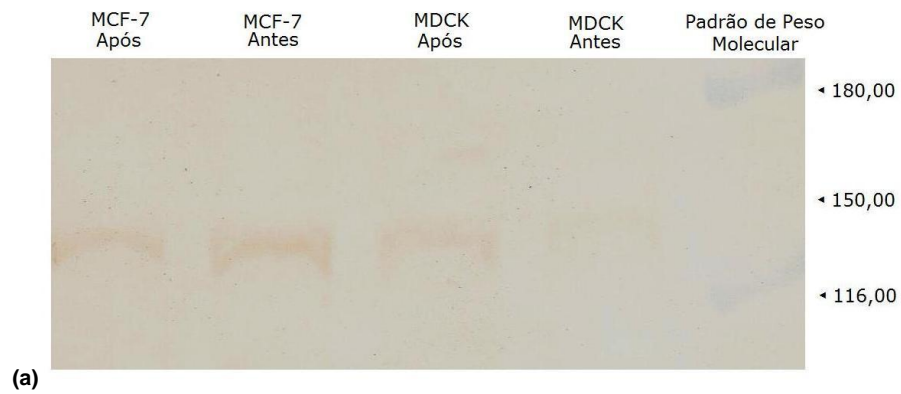
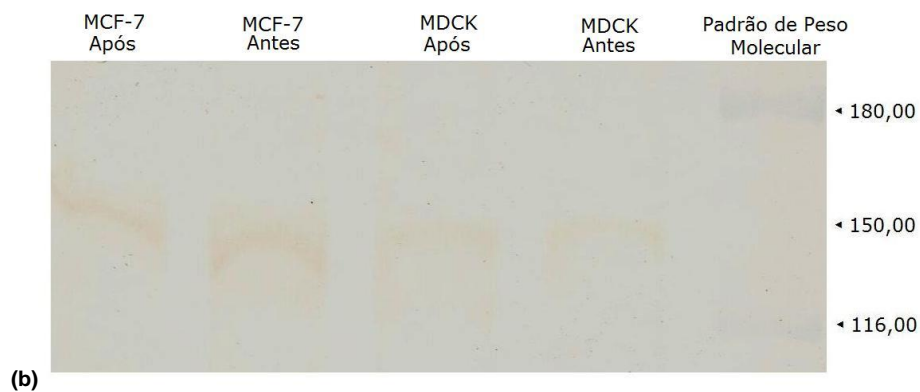


Figura 12 - Resultado da eletroforese unidimensional, com a indicação da proteína Desmogleína (fragmento de 150 KDa). A = padrão de peso molecular; B = MDCK antes da transição; C = MDCK após a transição; D = MCF-7 antes da transição; e E = MCF-7 após a transição. Coloração por prata.



(a)



(b)

Figura 13 – Resultados do western blot (a e b são repetições). Note a marcação para a proteína Dsg (peso molecular \approx 150 KDa) para as amostras das células MCF-7 e MDCK antes e após a transição do padrão de crescimento.

Assim, as células MCF-7, derivadas de tumor de mama humana dependente de estrógeno, foram as que apresentaram maior expressão da desmogleína, de acordo com o resultado do *western blot*, sendo que as células antes da transição fenotípica de crescimento – período de crescimento em que apresentam crescimento regido por leis de potência, com agregados sem tamanho característico, e raros agregados grandes – apresentaram a maior quantidade de desmogleína das quatro amostras analisadas. Entre as amostras de MDCK, a expressão de desmogleína se apresentou mais elevada após a transição fenotípica, quando os agregados apresentam um fenótipo de maior adesividade, e os agregados são grandes, aparentando terem se formado pela união de vários agregados menores (Figuras 14 e 17).

A partir dessas observações, pode-se inferir uma relação entre o nível da expressão de desmogleína e as características fenotípicas de crescimento de cada uma das linhagens utilizadas no experimento, que será discutida mais adiante e que constitui um primeiro passo no esclarecimento do papel da desmogleína como um agente regulador do ciclo celular.

5.2 Imunofluorescência

As imagens obtidas a partir de imunofluorescência, por marcação com anticorpo primário específico contra a desmoplaquina, 11-5F (PARRISH et al., 1987), outra proteína desmossômica, e anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) estão de acordo com o resultado do *western blot*, indicando a presença de mais proteínas desmossômicas nas células MCF-7 do que nas células MDCK. Dentro da mesma linhagem, as MCF-7 antes da transição apresentaram uma marcação mais intensa e abundante para as proteínas desmossômicas, e na MDCK foi observado o contrário, ou seja, marcação mais intensa após a transição (Figuras 15 e 16). Desta forma, os

resultados das duas análises, *western blotting* e imunofluorescência, foram condizentes entre si, indicando maior número de proteínas desmossômicas organizadas na membrana celular nas células MCF-7 do que nas células MDCK, sendo que as MCF-7 antes da transição apresentam maior quantidade de proteínas de todas as amostras, e as MDCK depois da transição, apresentam a menor quantidade.

Nas células MDCK, derivadas de células epiteliais normais de rim de cão, a transição fenotípica descoberta por Vilela e Martins e descrita por Mendes et al. (2001) foi representada por uma mudança no padrão de crescimento exponencial para um regimento por leis de potência. Inicialmente, as células formavam agregados de tamanhos característicos, com raros agregados maiores. Após a transição, os agregados apresentam-se de tamanhos variados, o que leva a crer que os agregados menores se agruparam, dando origem a outros de diferentes tamanhos (Figura 14). Esta nova formação, com agregados mais compactos, indica um fenótipo de maior adesividade. Assim sendo, é de se esperar que as proteínas que desempenham papel de adesão estejam presentes em níveis mais elevados nas células, conforme foi observado nas análises do presente estudo, pelo aumento da expressão de desmogleína após a transição. Esta transição, que neste caso ocorre ao início da fase estacionária do crescimento celular, pode aparecer como resposta às condições continuamente desfavoráveis após longo tempo de permanência em cultura, uma vez que os nutrientes do meio de cultura vão de extinguindo, a concentração de excretas celulares aumenta, e o pH do meio apresenta-se bastante alterado, com tendência a elevada acidez.

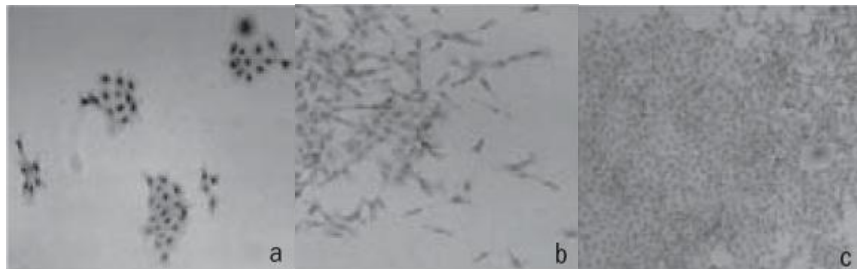


Figura 14 – Células MDCK em cultura em monocamada. (a) baixa densidade; (b) semiconfluência; (c) confluência (a – aumento de 12,5x; b e c – aumento de 25x) (VILELA et al., 2003).

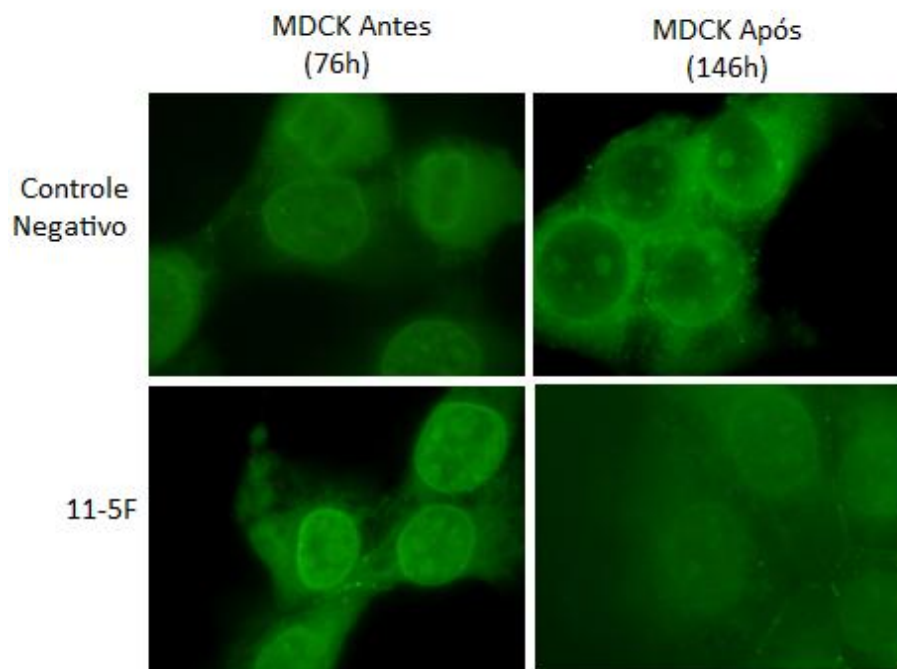


Figura 15 – Imunofluorescência das células MDCK antes e após a transição. Os controles negativos não receberam o anticorpo primário 11-5F(Aumento: 1000x)

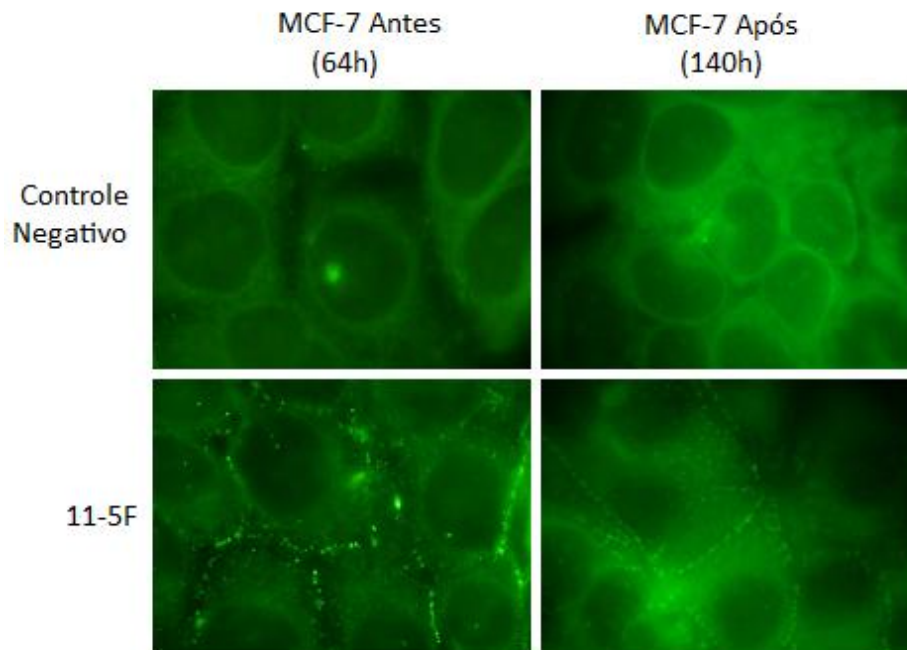


Figura 16 - Imunofluorescência das células MCF-7 antes e após a transição. Os controles negativos não receberam o anticorpo primário 11-5F (Aumento: 1000x).

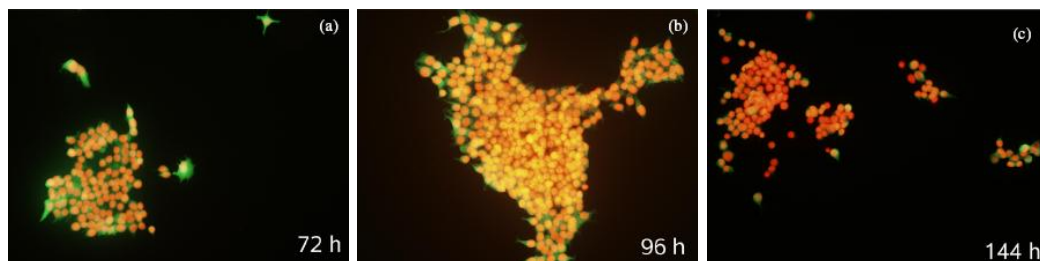


Figura 17 – Padrão de crescimento típico das células MCF-7. Os tempos de amostragem estão indicados nas fotos (Gentileza do Professor Marcelo José Vilela).

Assim, a transição fenotípica, neste caso, atua como uma forma de otimização do crescimento, visto que nas condições que se estabelecem após longo tempo em cultura, a formação dos agregados maiores e de maior adesividade possibilita maior proteção para as células. Esta transformação é dirigida por interações celulares e alterações acumuladas ao longo dos ciclos de vida das diferentes gerações celulares.

Já nas células MCF-7, de tumor de mama humana, a transição fenotípica observada no padrão de crescimento foi de um regime de leis de potência para um padrão exponencial, ao contrário do que foi encontrado para a linhagem derivada de células epiteliais normais. Por conseguinte, na linhagem de células cancerosas, inicialmente podem ser identificados agregados celulares sem tamanho característico, com raros agregados grandes. Nesta primeira fase, Vilela et al. (2007) relatam que os agregados observados são compactos, com bordas suaves. Após a transição, quando o crescimento passa para o regime exponencial, os agregados passam a ter tamanho característico, como se os agregados maiores tivessem se partido e formado agregados menores. Estes apresentam bordas irregulares, diferentes dos agregados vistos antes da transição (Figura 17). O fenótipo adquirido seria de adesão menos eficiente, o que pode estar relacionado à maior capacidade invasiva, característica que pode ser favorável para esta linhagem, visto que as células em questão são cancerosas.

Portanto, a partir dos resultados das análises aqui apresentadas, nota-se uma relação entre os níveis de expressão da desmogleína, em relação às alterações nos padrões de crescimento das linhagens celulares estudadas, de modo que as fases de crescimento regidas por leis de potência se relacionam à presença de fenótipo de maior adesividade nas diferentes linhagens, com expressão mais elevada de desmogleína, enquanto as fases regidas por decaimento exponencial são caracterizadas por menor expressão da proteína desmossômica, e conseqüentemente, menor adesividade. No caso das células tumorais, isso pode implicar em maior invasividade dos tecidos adjacentes, nas fases mais avançadas de desenvolvimento.

Estudos realizados até o presente momento indicam papel importante das proteínas desmossômicas em processos de sinalização celular relacionados ao controle do ciclo celular, ressaltando as alterações de expressão de tais proteínas em associação a distúrbios do crescimento celular (BIEDERMAN et al., 2005; YASHIRO et al., 2006; KHAN et al.,

2006; OSHIRO et al., 2005; KURZEN et al., 2003; CHEN et al., 2007). Dentre as proteínas constituintes dos desmossomas, o principal foco das pesquisas tem sido a placoglobina (Pg). Essa proteína da família das proteínas armadillo interage diretamente com as caderinas desmossômicas (Figura 18), contudo, pode ser encontrada tanto nos desmossomas quanto nas zônulas de adesão, onde pode ser permutável com a β -catenina (GARROD & CHIDGEY, 2008; DUSEK et al., 2007; HUBER, 2003; WITCHER et al, 1996).

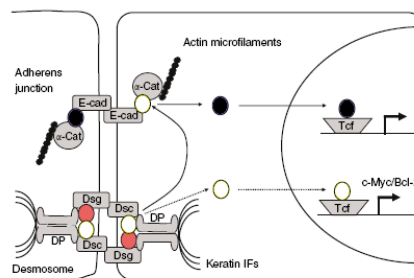


Figura 18 – Modelos de atuação da placoglobina como proteína reguladora do ciclo celular, dependente ou independentemente da β -catenina. Círculo preto, β -catenina; círculo branco, placoglobina; círculo cinza, a desmoplaquina. Modificado de CHIDGEY E DAWSON, 2007.

Desta forma, as pesquisas atuais procuram rever o conceito inicial do desmossoma como uma entidade meramente estrutural, substituindo-o por um conceito dinâmico. A placoglobina e a β -catenina são proteínas da mesma família, das proteínas *armadillo*, e possuem uma seqüência estrutural bastante semelhante, ambas com 12 repetições armadillo centrais, formadas por 42 aminoácidos cada uma, com 76% de identidade (homologia) entre as duas proteínas. Elas diferem nos terminais N e C, onde compartilham somente 20 e 41% de identidade, respectivamente (Figura 19). Devido à relação encontrada entre a placoglobina presente nos desmossomas e a β -catenina, acredita-se que essas estruturas de adesão podem modular vias de sinalização celular por meio de mecanismos diversos de regulação da disponibilidade de placoglobina (MIRAVET et al., 2002).

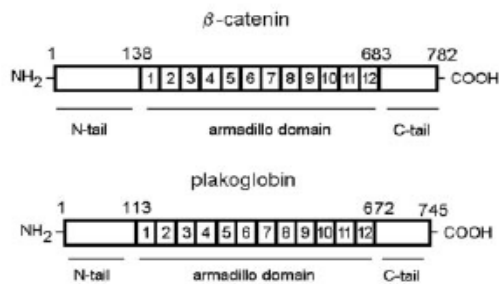


Figura 19 – Semelhança estrutural entre a β-catenina e a placoglobina. Observe os domínios, cujos tamanhos estão indicados na figura (MIRAVET et al., 2002).

Um dos modelos que tenta explicar como os desmossomas podem contribuir para a tumorigênese, baseia-se na atuação da β-catenina como co-ativador transcricional, através de interação com membros das famílias dos fatores transcricionais TCF/LEF-1 (Figura 18). Neste caso, a β-catenina interage com os 50 primeiros resíduos do N-terminal do Tcf-4, enquanto a placoglobina desmossômica se liga aos resíduos 51-80. Existem duas hipóteses para o funcionamento desta via, na qual a placoglobina atua como reguladora indireta do ciclo celular. A placoglobina pode ser liberada do desmossoma, como resultado da perda ou modulação da expressão de caderinas desmossômicas, deslocando β-catenina da zônula de adesão. A β-catenina seria então translocada para o núcleo, onde estimularia a transcrição de genes que em última análise irão estimular a proliferação celular. A segunda hipótese consiste na translocação da própria placoglobina liberada a partir dos desmossomas para o núcleo, onde estimula a transcrição de genes como *c-myc* ou Bcl-2, também promovendo a proliferação celular (CHIDGEY & DAWSON, 2007). Desta forma, os indícios apontam para estes dois mecanismos de atuação da placoglobina desmossômica sobre o ciclo celular, em que ela poderia atuar de forma dependente da β-catenina (MILLER & MOON, 1997) ou de forma independente da β-catenina, ativando diretamente o gene *c-myc* (KOLLINGS et al., 2000), ou induzindo a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (HAKIMELAHI et al., 2000).

Outro trabalho sugere, ainda, a existência de uma via regulatória entre Bcl-2 e caderinas existentes nas junções intercelulares, o que indica

que pode haver algum tipo de feedback negativo entre os genes que controlam o ciclo celular e as proteínas constituintes das estruturas de adesão. O funcionamento exato deste mecanismo, no entanto, não está esclarecido (LI et al., 2003).

Ainda considerando-se a inibição de caderinas induzida pela superexpressão do gene Bcl-2, a redução de desmogleína observada nas células MCF-7 pode ser relacionada à ocorrência de uma transição epitelial mesenquimal (TEM) (LI et al., 2003). Neste tipo de evento, as células epiteliais adquirem um fenótipo de características mesenquimais, de menor adesividade e, por conseguinte, mais potencial invasivo (CHIDGEY & DAWSON, 2007). Este tipo de transição fenotípica é importante na formação de tumores derivado de células epiteliais de alta invasividade. Assim, essas células têm seu poder de proliferação estimulado, pela expressão aumentada do Bcl-2, anti-apoptótico, bem como a invasividade, induzida por meio da redução da adesividade.

Considerando-se os resultados obtidos neste estudo, em que foi observada uma relação entre o nível de expressão de desmogleína pelas linhagens MDCK e MCF-7 e o padrão de crescimento destas células, e levando em conta a influência dessas caderinas desmossômicas sobre a disponibilidade citoplasmática da proteína placoglobina, pode-se estabelecer um paralelo entre os dois fatores supracitados. A expressão elevada de desmogleína nas fases de crescimento em que ambas as linhagens celulares apresentam crescimento regido por exponencial se relaciona diretamente à baixa adesividade encontrada nessas fases de desenvolvimentos das linhagens em estudo.

Nas células MDCK, a baixa expressão de desmogleína no início de seu desenvolvimento pode estar interferindo no processo de migração das células para a formação de agregados maiores, facilitando-o de modo a reduzir a influência negativa do meio sobre as células, em condições continuamente desfavoráveis. Ainda, com a redução de desmogleína desmossômica, maior quantidade de placoglobina é disponibilizada no citoplasma, para ser translocada para o núcleo, ou mesmo para as

zônulas de adesão, deslocando a β -catenina que atuará no núcleo ativando genes que estimulam a proliferação celular. Assim, ocorre um estímulo de crescimento para essas células.

No caso das células MCF-7, o nível reduzido de desmogleína, apesar de também estar diretamente relacionado à diminuição de adesividade, exerce outros efeitos sobre o desenvolvimento da linhagem. Tratando-se de células tumorais, é vantajoso que seja adquirido um fenótipo de menor adesividade ao longo de seu desenvolvimento, com menor expressão de desmogleína após a transição fenotípica (fase de crescimento regida por exponencial), de modo que a capacidade de invadir tecidos adjacentes é favorecida por esta nova característica. Não obstante, a redução de Dsg com conseqüente maior disponibilidade de placoglobina citoplasmática também irá influenciar positivamente o crescimento das células, dependente ou independentemente dos papéis da proteína β -catenina sobre algumas vias de regulação do ciclo celular, característica crucial no desenvolvimento de um tumor.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo são:

- i. A proteína desmogleína se expressa em diferentes níveis, tanto se comparando diferentes linhagens celulares, quanto diferentes fases de crescimento da mesma linhagem.
- ii. As células derivadas de tumor de mama humana apresentam níveis mais elevados de desmogleína do que as células epiteliais normais.
- iii. As fases de crescimento exponencial das duas linhagens analisadas apresentaram níveis mais reduzidos de Dsg, e as fases de crescimento regidas por distribuição em leis de potência apresentam os níveis mais elevados.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que, a partir deste estudo, novas pesquisas venham a ser realizadas, de modo a esclarecer os mecanismos pelos quais as proteínas desmossômicas, e mais especificamente, a desmogleína, se relacionam ao controle do ciclo celular. Com isso, novas tecnologias de diagnóstico de tumores podem ser desenvolvidas, por meio da detecção de alterações moleculares específicas de células cancerosas, bem como novas metodologias de tratamento, pela regulação da expressão de proteínas que atuam como controladoras diretas ou indiretas do ciclo celular normal e canceroso.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AMOUNDI, A.; DÍEZ, D.C.; BETTS, M.J.; FRANGAKIS, A.S. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. **Nature**, 450: 832-837, 2007.

BAISH, J.W., JAIN, R.K. Fractals and cancer. **Cancer Research**, 60: 3683-3688, 2000.

BIEDERMANN, K.; VOGELSANG, H.; BECKER, I.; PLASCHKE, S.; SIEWERT, J.R.; HOFER, H.; KELLER, G. Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. **J. Pathol.**, 207: 199–206, 2005.

BRENNAN, D.; HU, Y.; JOUBEH, S.; CHOI, Y.W.; WHITAKER-MENEZES, D.; O'BRIEN, T.; UITTO, J.; RODECK, U.; MAHONEY, M.G. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosisresistant phenotype to keratinocytes. **J. Cell Sci.**, 120: 758–771, 2007.

BRIEVA, T.; MOGHE, P.V. Exogenous cadherin microdisplay can interfere with endogenous signaling and reprogram gene expression in cultured hepatocytes. **Biotech. Bioeng.**, 85:283–92, 2004.

CALKINS, C.C.; SETZER, S.V.; JENNINGS, J.M.; SUMMERS, S.; TSUNODA, K.; AMAGAI, M.; KOWALCZYK, A.P. Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. **J. Biol. Chem.**, 281:7623–34, 2006.

- CHEN, Y.J.; CHANG, J.T.; LEE, L.; WANG, H.M.; LIAO, C.T.; CHIU, C.C.; CHEN, P.J.; CHENG, A.J. DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. **Oncogene**, 26: 467–476, 2007.
- CHIDGEY, M.; DAWSON, C. Desmosomes: a role in cancer? **Brit. J. Cancer**, 96: 1783 – 1787, 2007.
- CONN, I.G.; VILELA, M.J.; GARROD, D.R.; CROKER, J.; WALLACE, D.M.A. Immunohistochemical staining with monoclonal antibody 32-2B to desmosomal glycoprotein 1. **Br. J. Urol.**, 65: 176-180, 1990.
- CROSS, S.S. Fractals in pathology. **J. Pathol.**, 182: 1-8, 1997.
- CRUZ, W.B; VILELA, M.J. **Cultura de células de mamíferos**. Funarbe. 70p, 1999.
- DOCHERTY, R.J.; EDWARDS, G.; GARROD, R.; MATTEY, D.L. Chick embryonic pigmented retina is on the group of epithelioid tissues that lack cytokeratins and desmosomes and have intermediate filaments composed of vimentin. **J. Cell Sci.**, 71: 61-74, 1984.
- DUSEK, R.L., GETSIOS, S.; CHEN, F.; PARK, J.K.; AMARGO, E.V.; CRYNS, V.L.; GREEN, K.J. The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes. **J. Biol. Chem.**, 281(6): 3614-24, 2006.
- DUSEK, R.L.; GODSEL, L.M.; GREEN, K.J. Discriminating roles of desmosomal cadherins: Beyond desmosomal adhesion. **J. Dermat. Sci.**, 45: 7-21, 2007.

- ELISSON, J.; GARROD, D.R. Anchoring filaments of the amphibian epidermal-dermal junction traverse the basal lamina entirely from the plasma membrane of hemidesmosomes to the dermis. **J. Cell Sci.**, 72: 163-172, 1984.
- FARQUHAR, M.G.; PALADE, G.E. Junctional complexes in various epithelia. **J. Cell Biol.**, 17: 375-412, 1963.
- FRANKE, W.W.; MOLL, R.; MUELLER, H.; SCHMID, E.; KUHN, C.; KREPLER, R.; ARTLIEB, U.; DENK, H. Immunocytochemical identification of epithelium-derived human tumours with antibodies to desmosomal plaque proteins. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 80: 543-547, 1983.
- GARROD, D.R. Desmosomes and hemidesmosomes. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 15: 30-40, 1993.
- GARROD, D.R.; MERRITT, A.J.; NIE, Z. Desmosomal cadherins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 14: 537-45, 2002.
- GARROD, D.R.; CHIDGEY, M. Desmosomes structure, composition and function. **Biochim. Biophys. Acta**, 1778(3): 572-587, 2008.
- GETSIOS, S.; HUEN, A.C.; GREEN, K.J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 5: 271-281, 2004.
- GETSIOS, S.; AMARGO, E.V.; DUSEK, R.L.; ISHII, K.; SHEU, L.; GODSEL, L.M.; GREEN, K.J. Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. **Differentiation**, 72: 419-33, 2004a.

- GORBSKY, G.; STEINBERG, M.S. Isolation of intercellular glycoproteins of desmosomes. **J. Cell Biol.**, 90: 243-248, 1981.
- GREEN, K.J.; GAUNDRY, C.A. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 1:208-216, 2000.
- GREEN, K.J.; SIMPSON, C.L. Desmosomes: New Perspectives on a Classic. **J. Investigat. Dermat.**, 127: 2499–2515, 2007.
- GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, 84: 345–57, 1996.
- GUMBINER, B.M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 6: 622–34, 2005.
- HAKIMELAHI, S.; PARKER, H.R.; GILCHRIST, M.B.; LI, Z.; BLEACKY, R.C.; PASDAR, M. Plakoglobin regulates the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2. **J. Biol. Chem.**, 275: 10905–10911, 2000.
- HATZFELD, M. Plakophilins: multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? **Biochim. Biophys. Acta**, 1773: 69–77, 2007.
- HE, W.; COWIN, P.; STOKES, D.L. Untangling desmosomal knots with electron tomography. **Science**, 302(5642): 109-113, 2003.
- HUBER, O. Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. **Cell. Mol. Life Sci.**, 60: 1872-1890, 2003.
- HUNT, D.M.; RICKMAN, L.; WHITTOCK, N.V.; EADY, R.A.; SIMRAK, D.; DOPPING-HEPENSTAL, P.J.; STEVENS, H.P., ARMSTRONG, D.K.; HENNIES, H.C.; KUSTER, W.; HUGHES, A.E.; ARNEMANN, J.; LEIGH, I.M.; MCGRATH, J.A.; KELSELL, D.P.; BUXTON, R.S.

Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. **Eur. J. Hum. Genet.**, 9: 197–203, 2001.

INUZUKA, H.; MIYATANI, S.; TAKEICHI, M. R-cadherin: a novel Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. **Neuron.**, 7: 69–79, 1991.

ISHII, K.; NORVELL, S.M.; BANNON, L.J.; AMARGO, E.V.; PASCOE, L.T.; GREEN, K.J. Assembly of desmosomal cadherins into desmosomes is isoform dependent. **J. Invest. Dermatol.**, 117: 26-35, 2001.

JONES, D.B.; BRITTEN, K.M.; EDWARDS, J.; COWIN, P. Immunohistochemical demonstration of desmoplakin in human follicular dendritic cells (DRC). **J. Pathol.**, 148: 61, 1986.

KHAN, K.; HARDY, R.; HAQ, A.; OGUNBIYI, O.; MORTON, D.; CHIDGEY, M. Desmocollin switching in colorectal cancer. **Br. J. Cancer**, 95: 1367–1370, 2006.

KOLLIGS F.T.; KOLLIGS, B.; HAJRA, K.M.; HU, G.; TANI, M.; CHO, K.R.; FEARON, E.R. Catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of b-catenin. **Genes Dev.**, 14: 1319-1331, 2000.

KOTTKE, M.D.; DELVA, E.; KOWALCZYK, A.P. The desmosome: cell science lessons from human diseases. **J. Cell Sci.**, 119:797–806, 2006.

- KURZEN, H.; MUNZING, I.; HARTSCHUH, W. Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. **J. Cutan. Pathol.**, 30: 621–630, 2003.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LECKBAND, D.; PRAKASAM, A. Mechanism and Dynamics of cadherin adhesion, **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, 8: 259-287, 2006.
- LI, L.; BACKER, J.; WONG, A.S.K.; SCHWANKE, E.L.; STEWART, B.G.; PASDAR, M. Bcl-2 expression decreases cadherin-mediated cell-cell adhesion. **J. Cell Sci.**, 116: 3687-3700, 2003.
- LOPES, A., IYAYASU, H., LOPEZ, L.F., CASTRO, R.M., ALMEIDA, E.S. **Oncologia para graduação**. Ribeirão Preto, SP, Ed. Tecmed, 2005.
- MADIN, S.H.; DARBY, N.B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 98: 574-576, 1958.
- MANDELBROT, B.B. **The fractal geometry of nature**. Freeman, San Francisco, 1982.
- MENDES, R.L., SANTOS, A.A., MARTINS, M.L., VILELA, M.J. Cluster size distribution of cell aggregates in culture. **Physica A**, 298: 471-487, 2001.
- MIRAVET, S.; PIEDRA, J.; MIRÓ, F.; ITARTE, E.; HERREROS, A.G.; DUÑACH, M. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for b-catenin and placoglobin. **J. Biol. Chem.**, 277: 1884-1891, 2002.

- MONDA, L.; WARNKE, R.; ROSAI, J. A primary lymph node malignancy with features suggestive of dendritic reticulum cell differentiation. **Am. J. Pathol.**, 122: 562-572, 1986.
- MURPHY-ERDOSH, C.; YOSHIDA, C.K.; PARADIES, N.; REICHARDT, L.F. The cadherin-binding specificities of B-cadherin and LCAM. **J. Cell Biol.**, 129: 1379–90, 1995.
- NADLER, L.M.; RITZ, J.; HARDY, R.; PESANDO, J.M.; SCHLOSSMAN, S.F.; STASHENKO, P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of β cell origin. **J. Clin. Invest.**, 67(1): 134-140, 1981.
- NILES, L.A.; PARRY, D.A.D.; POWERS, E.E.; ANGST, B.D.; WAGNER, R.M.; GREEN, K.J. Structural analysis and expression of human desmogleína: a cadherin-like component of desmosome. **J. Cell Sci.**, 99: 82-821, 1991.
- NOSE, A.; NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. **Cell**, 54: 993–1001, 1988.
- ODA, H.; WADA, H.; TAGAWA, K.; YASUKO, A.; SATOH, N.; HUMPHREYS, T.; ZHANG, S.; TSUKITA, S. A novel amphioxus cadherin that localizes to epithelial adherens junctions has an unusual domain organization with implications for chordate phylogeny. **Evol. Develop.**, 4(6): 426-434, 2002.
- OSHIRO, M.M.; KIM, C.J.; WOZNIAK, R.J.; JUNK, D.J.; MUNOZ-RODRIGUEZ, J.L.; BURR, J.A.; FITZGERALD, M.; PAWAR, S.C.; CRESS, A.E.; DOMANN, F.E.; FUTSCHER, B.W. Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer. **Breast Cancer Res.**, 7: R669– R680, 2005.

- PARRISH, E.P.; STEART, P.V.; GARROD, D.R.; WELLER, R.O. Antidesmosomal monoclonal antibody in the diagnosis of intracranial tumors. **J. Pathol.**, 153(3): 265-273, 1987.
- PATEL, S.D.; CIATTO, C.; CHEN, C.P.; BAHNA, F.; RAJEBHOSALE, M.; ARKUS, N.; SCHIEREN, I.; JESSELL, T.M.; HONIG, B.; PRICE, S.R.; SHAPIRO, L. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. **Cell**, 124: 1255-68, 2006.
- PATTENGALE, P.K., GIDLUND, M., NILSSON, K.; SUNDSTRÖM, C.; ORN, A.; WIGZELL, H. Lysis of human β -lymphocyte-derived lymphoma/leukemia cells of established cell lines by interferon-activated natural killer (NK) cells. **Int. J. Cancer**, 28(4): 459-468, 1981.
- PETTITT, J. The cadherin superfamily. **WormBook**, 29:1-9, 2005.
- PORTER, K.R. Observation of the fine structure of animal epidermis. In: CONFERENCE ELECTRON MICROSC., 3: 281, 1956.
- RAMAEKERS, F.C.S.; HUYSMAN, A.; MOESKER, O.; KANT, A.; JAP, P. HERMAN, C.; VOOIJS, P. Monoclonal antibody to keratin filaments, specific for glandular epithelia and their tumours. Use in surgical pathology. **Labor. Inv.**, 42: 322-326, 1969.
- RUTMAN, A.J.; BUXTON, R.S.; BURDETT, I.D.J. Visualization by electron microscopy of the unique part of the cytoplasmic domain of a desmoglein, a cadherin-like protein of the desmosome type of cell junction. **FEBS Lett.**, 353: 194-196, 1994.
- SCHMIDT, A.; HEID, H.W.; SCHÄFER, S.; NUBER, U.A.; ZIMBELMANN, R.; FRANKE, W.W. Desmosomes and cytoskeletal architecture in

epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. **Eur. J. Cell Biol.**, 65: 229-245, 1994.

SCHMITT, C.J.; FRANKE, W.W.; GOERDT, S.; FALKOWSKA-HANSEN, B.; RICKELT, S.; PEITSCH, W.K. Homo- and Heterotypic Cell Contacts in Malignant Melanoma Cells and Desmoglein 2 as a Novel Solitary Surface Glycoprotein. **J. Invest. Dermat.**, 127, 2191–2206, 2007.

SEMLER, E.; DASGUPTA, A.; MOGHE, P.V. Cytomimetic engineering of hepatocyte morphogenesis and function by substrate-based presentation of acellular E-cadherin. **Tissue Eng.**, 11: 734–50, 2005a.

SEMLER, E.; LANCIN, P.A.; DASGUPTA, A.; MOGHE, P.V. Engineering hepatocellular morphogenesis and function via ligand-presenting hydrogels with graded mechanical compliance. **Biotech. Bioeng.**, 89: 296–307, 2005b.

SKERROW, C.J.; MATOLTSY, A.G. Isolation of epidermal desmosomes. **J. Cell Biol.**, 63: 515-523, 1974.

SMITH Jr., T.G.; BEHAR, T.N. Comparative fractal analysis of cultured glia derived from optic nerve and brain demonstrate different rates of morphological differentiation. **Brain Res.**, 634: 181-190, 1994.

SOULE, H.D.; VASQUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, 51(5): 1409-16, 1973.

STOKES, D.L. Desmosomes from a structural perspective. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 19(5): 565–571, 2007.

SUNDSTROM, C., NILSSON, K. Human malignant lymphomas in vitro. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, 86: 173-184, 1978.

SYED, S-E-H.; TRINNAMAN, B.; MARTIN, S.; MAJOR, S.; HUTCHINSON, J.; MAGEE, A.I. Molecular interactions between desmosomal cadherins. **Biochem. J.**, 362: 317-327, 2002.

TANABE, K.; TAKEICHI, M.; NAKAGAWA, S. Identification of a nonchordate-type classic cadherin in vertebrates: chicken Hz-cadherin is expressed in horizontal cells of the neural retina and contains a nonchordate-specific domain complex. **Develop. Dynam.**, 229: 899-906, 2004.

TSELEPIS, C.; CHIDGEY, M.; NORTH, A.; GARROD, D. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 8064-8069, 1998.

VILELA, M.J.; PARRISH, E.P.; WRIGHT, D. H.; GARROD, D.R. Monoclonal antibody to desmosomal glycoprotein 1. A new epithelial marker for diagnostic pathology. **J. Pathol.**, 153: 365-375, 1987.

VILELA, M.J. **Monoclonal antibodies to desmosomal glycoprotein 1: their contribution to cancer diagnosis and protein structure studies** University of Southampton. Tese (PhD). 243 p, 1989.

VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; BOSCHETTI, S.R. Fractal Patterns for Cells in Culture. **J. Pathol.**, 177: 103-107, 1995.

VILELA, M.J, MARTINS, M.L., BRAGA, J.L. Câncer: biologia, fractais e inteligência artificial. **Ciência Hoje**, 24 (141): 16-25, 1998.

- VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; MENDES, R.L.; SANTOS, A.A. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 39(1): 67-72, 2003.
- VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; RENATO, N.S.; CAZARES, L.; LATTANZIO, F.; WARD, M.; SEMMES, O.J. Proteomic and fractal analysis of a phenotypic transition in the growth of human breast cells in culture. **J. Stat. Mech.**, 12: p12006, 2007.
- WASCHKE, J. The desmosome and pemphigus. **Histochem. Cell Biol.**, 130 (1): 21-54, 2008.
- WEIBEL, E.R. Fractal geometry: a design principle for living organisms. **Am. J. Physiol.**, 261: L361-L369, 1991.
- WITCHERT, L.L.; COLLINS, R.; PUTTAGUNTA, S.; MECHANIC, S.E.; MUNSON, M.; GUMBINER, B.; COWIN, P. Desmosomal cadherin binding domains of placoglobina. **J. Biol. Chem.**, 271(18): 10904-10909, 1996.
- YASHIRO, M.; NISHIOKA, N.; HIRAKAWA, K. Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. **Eur. J. Cancer.**, 42: 2397–2403, 2006.
- YIN, T.; GREEN, K.J. Regulation of desmosome assembly and adhesion. **Semin. Cell Dev. Biol.**, 15: 665–77, 2004.