

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ORGANIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS LINFONODOS
INFILTRADOS PELO LINFOMA HISTIOCÍTICO VERDADEIRO. IMPORTÂNCIA
DA FIBRONECTINA COMO MOLÉCULA CENTRAL NA PROGRESSÃO
TUMORAL**

MARCO AUGUSTO STIMAMIGLIO

**FLORIANÓPOLIS
2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ORGANIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS LINFONODOS
INFILTRADOS PELO LINFOMA HISTIOCÍTICO VERDADEIRO. IMPORTÂNCIA
DA FIBRONECTINA COMO MOLÉCULA CENTRAL NA PROGRESSÃO
TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva

MARCO AUGUSTO STIMAMIGLIO

FLORIANÓPOLIS

2004

“No mundo conhecereis tribulações, mas tende coragem: eu venci o mundo”.(Jo 16,33)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e pelas oportunidades que me trazem ensinamentos e permitem a elevação do meu espírito.

À minha amada esposa Marcele que me acompanha e apóia nas decisões e desafios, compartilhando sentimentos e atitudes vividos durante esta caminhada. Parafraseando Mozart, acredito que não basta talento e força para fazer uma grande obra, é preciso também viver um grande amor.

Aos meus pais e irmãos pelo amor dedicado e pelo exemplo sempre presente em minha vida e que me permitiram chegar até aqui.

A toda a família pelo apoio e pela força alcançada através dos momentos de agradecimento e rogo junto ao Pai.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva, pela confiança em meu trabalho e pela oportunidade e incentivo na realização deste.

À Prof^a. Dra. Andréa Golçalvez Trentin, pelos ensinamentos e confiança em mim depositada.

À Prof^a. Dra. Cidônia de Lourdes Vituri, por estar sempre disposta a me ajudar, seja com sua disponibilidade e atenção ou através do empréstimo de equipamentos e reagentes.

Ao Hemocentro de Santa Catarina, pela disponibilidade de equipamentos e estrutura física, com extensão a Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues, a Mari e a Carol, pelo auxílio durante a confecção das marcações realizadas no laboratório de hemopatologia deste centro.

Aos colegas e amigos do mestrado, pela amizade e ótimos momentos compartilhados.

Aos eternos amigos, Ricardo, Cláudia, Giordano, Evaldo, Aloísio, Marcos, Bruno, Ezequiel, Fabíola, Carlos, Meline, Pâmela, Talita, Cinara e aos mais novos integrantes da família LNH: conhecer vocês foi um privilégio, ter a sua amizade um presente divino. “A amizade tem o poder de afastar os medos, desfazer as amarras, sustentar o golpe fatal, amparar a queda, reatar as partes, clarear as sombras da alma, recobrar as forças e fazer começo o que já era fim”.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRAT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
2.1 OBJETIVO GERAL.....	05
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	05
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	06
3.1 ASPECTOS GERAIS DAS NEOPLASIAS.....	07
3.1.1 Linfoma Histiocítico Verdadeiro.....	08
3.2. MATRIZ EXTRACELULAR.....	10
3.2.1 O Arcabouço de Colágeno.....	13
3.2.2 Laminina.....	15
3.2.3 Fibronectina.....	18
3.2.4 Proteoglicanos.....	20
4. METODOLOGIA.....	23
4.1 MATERIAIS.....	24
4.2 EQUIPAMENTOS.....	24
4.3 CULTURA DE CÉLULAS.....	25
4.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM CLORATO DE SÓDIO OU β - XILOSÍDEO.....	25
4.5 PREPARO DAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	26
4.6 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR – MÉTODO DO MTT.....	26
4.7 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR – CONTAGEM DE CÉLULAS.....	27
4.8 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MÉTODO DO MTT.....	27
4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – CONTAGEM DE CÉLULAS.....	28
4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	28
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5. RESULTADOS.....	30

5.1 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS LINFONODOS.....	31
5.1.1 Avaliação da deposição de laminina nos linfonodos normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro.....	31
5.1.2 Avaliação da deposição de fibronectina nos linfonodos normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro.....	32
5.1.3 Avaliação da deposição de colágeno tipo IV nos linfonodos normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro.....	32
5.2 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR SOBRE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	36
5.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR SOBRE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	38
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORATO DE SÓDIO OU DO β -XILOSÍDEO SOBRE A ADESÃO CELULAR EM FIBRONECTINA.....	40
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORATO DE SÓDIO OU DO β -XILOSÍDEO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FIBRONECTINA.....	40
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ultraestrutura da matriz extracelular.....	11
Figura 2	(A) Modelo da estrutura molecular da membrana basal; (B) Representação esquemática da molécula e colágeno tipo IV.....	15
Figura 3	Representação esquemática da molécula de laminina-1.....	16
Figura 4	Domínios estruturais da fibronectina.....	18
Figura 5	Estrutura dos proteoglicanos.....	21
Figura 6	Corte histológico de linfonodo humano normal com marcação para laminina.....	33
Figura 7	Corte histológico de linfonodo humano comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro com marcação para laminina.....	33
Figura 8	Corte histológico de linfonodo humano normal com marcação para fibronectina.....	34
Figura 9	Corte histológico de linfonodo humano comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro com marcação para fibronectina...	34
Figura 10	Corte histológico de linfonodo humano normal com marcação para colágeno tipo IV.....	35
Figura 11	Corte histológico de linfonodo humano comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro com marcação para colágeno tipo IV.....	35
Figura 12	Perfil de adesão das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado através do método do MTT.....	37
Figura 13	Perfil de adesão das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado através da contagem das células aderidas.	37
Figura 14	Perfil da proliferação das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado pelo método do MTT.....	39
Figura 15	Perfil da proliferação das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado através da contagem das células em câmara de Neubauer.....	39
Figura 16	Perfil da adesão das células U-937 nas condições controle, tratadas com clorato de sódio ou β -xilósídeo sobre substratos compostos por albumina sérica bovina ou fibronectina.....	41

Figura 17	Perfil da proliferação das células U-937 nas condições controle, tratadas com clorato de sódio ou β -xilósídeo sobre substratos compostos por albumina sérica bovina ou fibronectina.....	41
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Domínios de ligação da fibronectina e seus significados funcionais	19
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

β -xilósídeo	Metil β -D-xilopiranosídeo
BSA	Albumina sérica bovina
COL IV	Colágeno tipo IV
FN	Fibronectina
GAGs	Glicosaminoglicanos
IMDM	Meio de cultura Iscove modificado por Dulbecco
LHV	Linfoma histiocítico verdadeiro
LN	Laminina
MEC	Matriz extracelular
MTT	2,5 difenil brometo de tetrazólio
PBS	Solução tampão fosfato
PGs	Proteoglicanos
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio

RESUMO

A matriz extracelular (MEC) representa um complexo macromolecular que determina a histoarquitetura específica de cada tecido servindo como um arcabouço para a adesão celular e codificando informações que podem ser transmitidas para os domínios internos das células modulando, desta maneira, a atividade celular. Durante os processos neoplásicos ocorrem determinadas mudanças no estroma tecidual (componentes celulares e extracelulares) que conduzem as células tumorais a um padrão invasivo e metastático. Estas alterações teciduais decorrentes do estabelecimento tumoral podem variar de acordo com seu tecido de origem e os sítios de invasões secundárias. O linfoma histiocítico verdadeiro (LHV) representa uma das neoplasias mais raras e agressivas entre os linfomas Não-Hodgkin. Linhagens celulares de LHV, como a linhagem U-937, já foram isoladas e representam um modelo bastante útil para a investigação dos efeitos de variados agentes sobre a progressão deste tipo de tumor. Em consonância com o exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar a deposição tecidual de proteínas da MEC em um caso de LHV e analisar a influência destas proteínas sobre o estabelecimento e a progressão tumoral. Para isso foram realizadas imunomarcações para as proteínas laminina (LN), fibronectina (FN) e colágeno tipo IV (COL IV) em linfonodos normal e comprometido por LHV. Foram realizados também testes de adesão e proliferação das células U-937 sobre substratos compostos por LN, FN ou COL IV. Por fim, as células foram tratadas com drogas (clorato de sódio ou β -xilósídeo) que alteram as propriedades dos proteoglicanos para se avaliar a participação destes durante os processos de adesão e proliferação celular. Os cortes histológicos avaliados apresentaram marcação, para todas as proteínas testadas, no córtex e na cápsula do linfonodo normal. No linfonodo comprometido por LHV foi verificada uma deposição diferencial das proteínas da MEC avaliadas, principalmente da FN que apresentou um grande aumento. Os estudos *in vitro* demonstraram que esta proteína proporcionou um maior potencial de adesão e proliferação das células U-937 quando comparada aos demais substratos. O tratamento destas células com clorato de sódio ou β -xilósídeo reduziu a taxa de proliferação celular, mas não foi capaz de modificar o padrão de adesão das células aos substratos de FN. Os resultados demonstraram que alterações no estroma linfonodal podem ocorrer durante a progressão do LHV e que estas alterações podem afetar diretamente a adesão e a proliferação das células tumorais, efeitos estes relacionados a receptores de superfície celular, que neste modelo evidenciam a importância dos proteoglicanos na proliferação celular sobre substratos de FN.

Palavras-chave: matriz extracelular, laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, proteoglicanos, adesão, proliferação, linfoma histiocítico verdadeiro.

ABSTRACT

Extracellular matrix organization in the lymph node compromised with true histiocytic lymphoma. The importance of fibronectin as a central molecule in tumour progression

The extracellular matrix (ECM) represents a macromolecular complex that determines the tissue specific hystoarchitecture serving as a scaffold to cellular adhesion and codifying information that could be transmitted to internal cellular domains modulating cell behaviour. During the neoplastic process changes occur on tissue stroma (cellular and extracellular components) that drives the tumor cells to invasion and metastasis. These tissue alterations can change according to the tissue origin and the sites of secondary invasion. The true histiocytic lymphoma (THL) represents a rare and aggressive Non-Hodgkin lymphoma. THL cellular lineages, as U-937, were established and are used as a useful model to investigate the effects of various agents on tumor progression. According to this the aim of this work was to evaluate tissue deposition of ECM proteins in a case of THL and analyze the influence of these proteins on tumor establishment and progression. To this immunostaining was achieved for the proteins laminin (LN), fibronectin (FN) and type IV collagen (COL IV) in normal and THL compromised lymph nodes. We realized too experiments of U-937 cells adhesion and proliferation on LN, FN or COL IV substrates. Finally, the cells were treated with drugs (sodium chlorate or β -xyloside) that alters the properties of proteoglycans to achieve its participation during the processes of cellular adhesion and proliferation. The histological slices analyzed present ECM proteins staining on the cortex and the capsule of normal lymph node. In the compromised THL lymph node was verified a differential ECM proteins deposition, principally FN that presents a great amount. The *in vitro* studies demonstrated that this protein provided a great potential of U-937 cells adhesion and proliferation when compared with the other substrates. The treatment of these cells with sodium chlorate or β -xyloside reduced the cellular proliferation ratio, but was not capable to modify the pattern of cellular adhesion on FN substrates. These results demonstrated that the changes on lymph node stroma can occur during the THL progression and these changes can directly affect the tumor cell adhesion and proliferation. These effects were related to cell surface receptors that, in this model, show the importance of proteoglycans in cellular proliferation on FN substrates.

Key words: extracellular matrix, laminin, fibronectin, type IV collagen, proteoglycans, adhesion, proliferation, true histiocytic lymphoma.

1 INTRODUÇÃO

Até pouco tempo atrás se aceitava a visão que sugeria um papel totalmente passivo para os componentes da matriz extracelular (MEC) que se acham distribuídos em todos os tecidos e órgãos do corpo: um arcabouço inerte que estabiliza a estrutura física dos tecidos. Entretanto, nas duas últimas décadas, o estudo da MEC tem demonstrado que, ao contrário do que se pensava, ela representa uma estrutura extremamente dinâmica. Dinâmica porque, como quase todas as estruturas do corpo humano, a MEC está sujeita a constante renovação; dinâmica também porque a MEC é uma estrutura que apresenta um papel arquitetural durante o desenvolvimento fetal e durante a reparação tecidual; dinâmica, finalmente porque a função da MEC é extremamente interativa: as moléculas da MEC são secretadas e depositadas por células parenquimais adjacentes e, ao mesmo tempo, fornecem informações que modulam as atividades funcionais destas próprias células. Nos processos patológicos a MEC também desempenha um papel crucial. Ela é essencial na reparação tecidual após ferimentos, mas uma deposição excessiva de suas moléculas, durante a inflamação crônica ou doenças degenerativas, pode levar a disfunção dos órgãos. A MEC tem um papel chave no desenvolvimento do câncer, não somente porque a angiogênese é parte de reações do estroma tecidual que incluem deposição de proteínas da MEC, mas também porque ela tem um papel modulador durante os processos de invasão e metástase (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Durante todo o processo de desenvolvimento do câncer, sua progressão e metástase, o microambiente local do tecido hospedeiro pode ser um participante ativo. De acordo com LIOTTA e KOHN (2001), a invasão tumoral ocorre dentro de um microambiente tumor-hospedeiro, onde o estroma tecidual e as células tumorais permutam enzimas e citocinas que modificam a MEC local, estimulam a migração e promovem a proliferação e a sobrevivência das células tumorais. DE WEVER e MAREEL (2003), neste mesmo contexto, estabeleceram duas vias que enfatizam o papel do estroma tecidual (elementos celulares e extracelulares) no desenvolvimento tumoral: a via eferente, onde as células transformadas enviam sinais para as células estromais, para a MEC e para si próprias, alterando o comportamento, a função e a arquitetura tecidual; e a via aferente, onde as células estromais e a MEC interagem com as células transformadas produzindo sinais pró-invasivos, estimulando migração, proliferação e crescimento tumoral,

modificando a citoarquitetura e o potencial agressivo destas células transformadas. Neste sentido, um melhor entendimento das contribuições do estroma para a progressão tumoral irá, provavelmente, aumentar nosso conhecimento da importância de sinais combinatórios que auxiliam ou promovem crescimento, diferenciação, adesão, invasão, proliferação e sobrevivência ectópica, e conseqüentemente resultará na identificação de novos alvos terapêuticos para futuros tratamentos.

Segundo YAMADA e KEMLER (2002), como o número de moléculas que podem participar da interação entre célula e MEC se eleva às centenas (sem contar reguladores intracelulares), torna-se extremamente importante identificar as funções individuais destas moléculas. Pode ser difícil chegar a conclusões globais sobre a função de uma molécula em particular baseando-se em estudos com apenas um tipo de célula, entretanto, se torna extremamente necessário testar a diversidade e a complexidade funcional dentro de um contexto celular no qual uma proteína está presente. Valendo-se do estudo com linhagens celulares específicas, a complexidade destas interações estão se tornando compreensíveis, desta maneira vê-se a importância de entender esta constante comunicação entre célula-MEC e de que modo a MEC pode modular aspectos biológicos envolvidos em patologias específicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a deposição tecidual de proteínas da matriz extracelular (MEC) em um caso de Linfoma Histiocítico Verdadeiro (LHV) e avaliar a influência destas proteínas sobre a adesão e a proliferação de uma linhagem celular de LHV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a deposição tecidual de laminina, fibronectina e colágeno tipo IV em um caso de LHV;
- Avaliar as mudanças no conteúdo e nos aspectos teciduais das proteínas laminina, fibronectina e colágeno tipo IV em linfonodos normal e comprometido por LHV;
- Avaliar o efeito da laminina, da fibronectina e do colágeno tipo IV na modulação da adesão da linhagem U-937;
- Avaliar o efeito da laminina, da fibronectina e do colágeno tipo IV no controle da mitose, quantificando a proliferação da linhagem U-937;
- Verificar se existe correlação entre os resultados obtidos através dos testes do MTT e de contagem de células para a adesão e a proliferação da linhagem U-937 sobre proteínas da MEC;
- Avaliar o efeito do clorato de sódio e do β -xilósídeo, e, conseqüentemente, da função dos proteoglicanos e de suas propriedades na modulação da adesão e da proliferação das células U-937.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS DAS NEOPLASIAS

Adultos da espécie humana são compostos por aproximadamente 10^{15} células, muitas destas se dividem e diferenciam para repopular órgãos e tecidos que requerem renovação. Alguns exemplos são as células da lâmina basal da pele que se dividem, diferenciam e morrem ou células da medula óssea que se dividem e diferenciam para produzir as células sanguíneas, as quais possuem tempos de vida variados. Estes processos são controlados por uma rede de mecanismos moleculares que determinam, de um lado, a proliferação e, de outro, a morte celular, chamada apoptose quando resulta de um evento programado. Qualquer fator que altere esse equilíbrio entre divisão e morte celular tem o potencial, se não corrigido, de alterar o número total de células em um órgão ou tecido em particular. O aumento descontrolado da proliferação destas células pode ser clinicamente detectado como uma neoplasia (BERTRAM, 2001).

O desenvolvimento de uma neoplasia representa um processo de vários passos durante o qual uma célula adquire múltiplas mutações genéticas. Estas mutações geram duas alterações funcionais: mutações que aumentam a atividade das proteínas codificadas pelos chamados oncogenes; ou mutações que inativam a função de genes conhecidos como supressores de tumor (BERTRAM, 2001). Entretanto, o conhecimento adquirido somente através da catalogação de tais mutações genéticas no desenvolvimento tumoral é limitante, pois, mais que isso, o desenvolvimento do câncer está relacionado com as interações tumor-hospedeiro no qual o hospedeiro participa da indução, seleção e expansão das células neoplásicas através de sinalizações/informações provindas de elementos celulares e da matriz extracelular (MEC) do microambiente tumor-hospedeiro (FOLKMAN; HAHNFELDT; HLATKY, 2000; PARK; BISSELL; BARCELLOS-HOFF, 2000; LIOTTA; KOHN, 2001). Um exemplo desta interação, segundo LIOTTA e KOHN (2001), consiste no fato das células tumorais recrutarem o estroma hospedeiro (elementos celulares e extracelulares) para a produção e secreção de fatores de crescimento e citocinas que acabam por modificar a proliferação e o comportamento invasivo destas células tumorais. A invasão aos tecidos vizinhos e a sobrevivência ectópica são eventos cruciais para a progressão do câncer e são pré-requisitos na formação de tumores secundários (metástases). O hospedeiro co-regula estes fenômenos de invasão e metástase.

Evidências morfológicas na participação do hospedeiro são: aumento da deposição de MEC; presença de células inflamatórias; e angiogênese evidenciada pelo surgimento de novos vasos sanguíneos e linfáticos (DE WEVER; MAREEL, 2003).

A formação de metástases em órgãos distantes depende da liberação da célula neoplásica para a circulação sanguínea ou linfática, sobrevivência da célula no vaso durante a recirculação, migração da célula através dos vasos, extravasamento e proliferação no microambiente do novo tecido (UMANSKY; SCHIRRMACHER; ROCHA, 1996). A disseminação neoplásica tem início com a adesão celular às moléculas da MEC, degradação proteolítica desta MEC, migração e proliferação celular (JOHNSEN *et al.*, 1998; LAUWAET *et al.*, 2000; ENGBRING; KLEINMAN, 2003).

A progressão das células tumorais envolve muitos processos e moléculas, algumas das quais são coordenadamente reguladas. Muitos genes são inibidos ou estimulados proporcionando às células tumorais uma maior mobilidade e um maior potencial de invasão, permitindo seu crescimento em órgãos distantes. A matriz extracelular também tem uma profunda influência sobre a progressão tumoral e continua a ser uma área de ativas pesquisas para o entendimento dos mecanismos envolvidos neste processo (ENGBRING; KLEINMAN, 2003).

3.1.1 Linfoma Histiocítico Verdadeiro

O Linfoma Histiocítico Verdadeiro (LHV), também conhecido como Sarcoma Histiocítico Verdadeiro, é extremamente raro, ocorrendo em menos de 0,5% de todos os Linfomas Não-Hodgkin (BOUABDALLAH *et al.*, 2001). Seu conceito tem sido bastante controverso, mas, recentemente, aspectos morfológicos e imunofenotípicos foram associados ao LHV diferenciando-o das demais histiocitoses malignas. Segundo HARRIS e colaboradores (1999) o LHV é composto por células neoplásicas de diferenciação histiocítica: características morfológicas e expressão de marcadores da linhagem monocítica/macrofágica; e ausência de marcadores imunológicos específicos dos linfócitos T ou B. O seu

diagnóstico baseia-se nos aspectos clínicos e histológicos, associados ao estudo imunohistoquímico.

O curso desta neoplasia compartilha características dos mais agressivos Linfomas Não-Hodgkin. É uma doença preferencialmente localizada, mas pode se apresentar disseminada em alguns casos. Os aspectos clínicos mais comuns incluem redução de peso, febre, linfadenopatia e esplenomegalia. O trato gastrointestinal é a localização extranodal mais freqüente, mas locais atípicos de envolvimento como sistema nervoso central, ossos, pele, tecidos moles, rins, medula óssea, fígado e pulmão já foram descritos. O tumor exhibe um padrão difuso de grandes células frouxamente aderidas apresentando um citoplasma eosinofílico freqüentemente vacuolado. O núcleo pode ser esférico ou bastante irregular, algumas vezes retorcido ou cerebriforme com nucléolos proeminentes. A presença de células gigantes multinucleadas é freqüente. Nos linfonodos as células neoplásicas tendem a envolver os sinusóides (ELGUETANY, 1997).

Através da efusão pleural de um paciente caucasiano de 37 anos de idade, acometido por LHV, foi isolada e caracterizada uma linhagem celular conhecida como U-937 (SUNDSTROM; NILSSON, 1976). O estabelecimento da linhagem celular U-937 proporcionou uma contínua fonte de células humanas que representam um modelo bastante útil para a investigação dos efeitos de variados agentes sobre a disseminação de células neoplásicas e eventos como, adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, assim como estudos de efeitos fisiológicos e farmacológicos (SUNDSTROM; NILSSON, 1976; VOLPI *et al.*, 1994; CUSINATO *et al.*, 1999; STONEHOUSE *et al.*, 1999).

3.2 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (MEC) pode ser definida como uma mistura complexa e intrincada de macromoléculas precisamente organizadas. Este complexo macromolecular determina a histoarquitetura específica de cada tecido servindo como um sistema de malhas para a adesão celular e também representando um componente ativo dos tecidos, codificando informações que podem ser transmitidas para os domínios internos das células (SCOTT-BURDEN, 1994;

AUMAILLEY; GAYRAUD, 1998).

Secretada localmente, a MEC forma uma rede organizada associada à superfície celular que a produz. A interação destas células com a matriz é conduzida através de receptores de superfície celular, dos quais as integrinas constituem a classe mais importante, sendo responsáveis pela conexão da MEC com o citoesqueleto. Desta forma, a matriz pode regular o comportamento celular por estar diretamente relacionada com a modulação de cascatas de sinalização que controlam o crescimento celular, migração, diferenciação, sobrevivência e morfogênese (SCOTT-BURDEN, 1994; LUKASHEV; WERB, 1998).

A estrutura básica que compõe a MEC dos variados tecidos é definida por um arcabouço de colágeno. Glicoproteínas adesivas, como a laminina e a fibronectina, e proteoglicanos aderem a este arcabouço e interagem com as células que estão dentro ou adjacentes a esta estrutura. Entretanto, a matriz extracelular não representa uma estrutura estática, mas é constantemente remodelada pela ação de proteases, notadamente da família das metaloproteases (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Estas macromoléculas que compõem a MEC podem ser agrupadas em elementos que formam fibras (colágeno e elastina), glicoproteínas (incluindo laminina e fibronectina) e proteoglicanos. Exceções a esta classificação geral são glicoproteínas capazes de formar fibras e colágenos que não formam estruturas fibrosas. Alguns, como o colágeno do tipo IV, estão envolvidos na estruturas de malhas que formam a membrana basal (SCOTT-BURDEN, 1994). A ultraestrutura da matriz extracelular está ilustrada na figura 1. Nesta micrografia eletrônica, os dois principais domínios da MEC estão claramente identificados: a membrana basal, uma camada condensada de matriz que é formada nas adjacências do pólo basal de células epiteliais, outras células de cobertura (mesotélio, meningotélio e sinóvia), células musculares, células de schwann e adipócitos; e a matriz intersticial, secretada pelo tecido subjacente (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

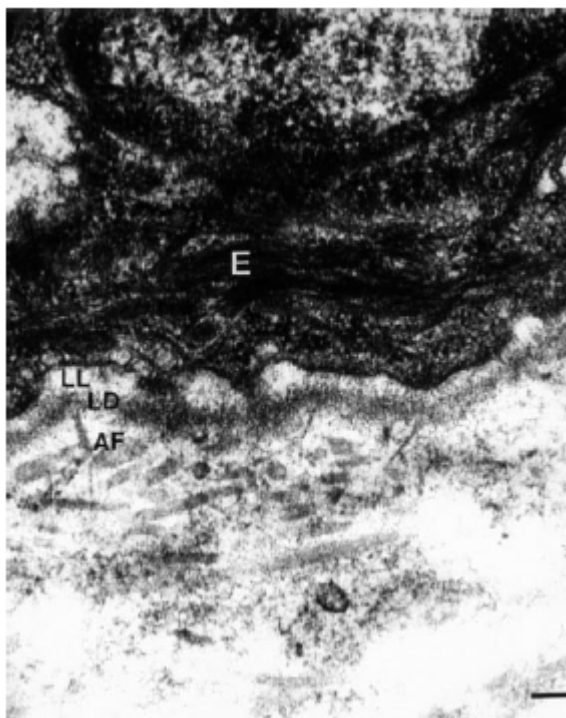


Figura 1. Ultraestrutura da matriz extracelular. Adjacente a uma célula epitelial (E) a membrana basal com sua lâmina lúcida (LL) e lâmina densa (LD). A matriz intersticial contém fibrilas de colágeno e está muito próxima às fibrilas de ancoragem (AF) da membrana basal, composta de colágeno tipo VII (barra de escala de 0,1 μ m). Extraído de: BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003.

A formação e função normal dos tecidos requerem uma correta expressão e função das proteínas de seu estroma (MEC). Alterações das propriedades estruturais, da expressão e das funções das proteínas da MEC, proteínas que degradam a MEC e receptores podem estar relacionadas a inúmeras doenças, inclusive câncer (LUKASHEV; WERB, 1998; PARK; BISSELL; BARCELLOS-HOFF, 2000). As alterações das moléculas envolvidas na interação célula-matriz extracelular constitui uma parte integral do mecanismo que regula a transformação de células normais em malignas. Células transformadas são geralmente caracterizadas por um decréscimo na taxa de expressão de proteínas da MEC, receptores de MEC e proteínas de adesão celular. Este decréscimo está relacionado com a transformação de variados tipos celulares, pois a restauração dos níveis normais de expressão destas moléculas reverte as características do fenótipo tumorigênico, como a morfologia celular anormal e o crescimento celular independente de adesão (BEN-ZE'EV, 1997).

Alguns exemplos do quão significantes são estas alterações das propriedades da MEC e da sua interação com as células são destacados a seguir:

YAMADA e OLDEN (1978) demonstraram que a adição de fibronectina a uma cultura de fibroblastos transformados restaurou a organização do citoesqueleto e a morfologia celular normal. De modo similar, TRAVERS e colaboradores (1996) estudando transformações no gene Ras, que causa decréscimo na expressão da cadeia $\alpha 2$ do colágeno tipo I, constataram que a sua re-expressão inibiu o crescimento independente de adesão, característica de células transformadas. O fenótipo celular maligno pode também ser revertido por moléculas que fazem a ligação da MEC com a porção citoplasmática celular, como é o caso das integrinas. O aumento na expressão das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ inibe o fenótipo tumorogênico e a capacidade metastática de diversas linhagens celulares (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1990; WEITZMAN; HEMLER; BRODT, 1996).

Assim como alguns aspectos da interação célula-matriz extracelular proporcionam um mecanismo que inibe o fenótipo tumorogênico celular, um diferente conjunto de interações pode aumentar esta manifestação em um contexto celular específico. Por exemplo, a superexpressão da integrina $\alpha 2\beta 1$ em uma linhagem celular de sarcoma aumenta a tumorogenicidade celular e seu potencial metastático (CHAN *et al.*, 1991). WEAVER e colaboradores (1997) demonstraram que integrinas $\beta 1$ promovem o aparecimento do fenótipo tumorogênico em células de carcinoma mamário. DE ARCANGELIS e colaboradores (2001), trabalhando com uma linhagem celular de câncer de cólon transfectada para expressão de cadeias $\alpha 1$ de laminina, detectaram um aumento significativo no crescimento tumoral quando esta era injetada em ratos. HAN e colaboradores (2004) verificaram que o aumento da deposição de fibronectina estimulou a proliferação celular e diminuiu a apoptose em células de carcinoma de pulmão.

Pelo exposto acima e segundo LUKASHEV e WERB (1998), verifica-se que a regulação via sinalização pela matriz extracelular para a expressão do fenótipo celular maligno pode variar dependendo do tipo celular, do estado de outros mecanismos de sinalização e do contexto celular na interação com as proteínas da MEC.

Para entender melhor a composição deste complexo macromolecular e a interação de seus componentes entre si e com as proteínas de membrana das

células e sua conseqüente sinalização e regulação, algumas proteínas específicas para as quais conceitos abrangentes têm sido desenvolvidos com respeito a sua organização dentro da MEC e suas funções biológicas devem ser estudadas.

3.2.1 O Arcabouço de Colágeno

Os colágenos são proteínas onipresentes responsáveis pela manutenção da integridade estrutural de vertebrados e muitos outros organismos. Já foram identificados mais de vinte tipos de colágenos geneticamente distintos, que possuem funções biológicas e organização estrutural diferentes (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Em tecidos resistentes à tensão ou à pressão, como os tendões, ossos, cartilagens e pele, o colágeno se arranja em forma de fibras, proporcionando resistência a estes tecidos. Somente colágenos do tipo I, II, III, V e XI se auto-accumulam em fibrilas. Esta formação de fibrilas consiste em um processo extracelular, no qual participam metaloproteinases específicas para cada tipo de colágeno. Alguns tipos de colágeno formam redes através do contato entre suas partes. Estes são os colágenos do tipo IV, VIII e X. Um exemplo típico da formação de uma rede formada principalmente por colágeno do tipo IV é a membrana basal. Outros tipos de colágeno podem estar associados com fibrilas de superfície celular (tipos VI, IX, XII e XIV), ou constituem proteínas transmembranares como os colágenos do tipo XIII e XVIII (HULMES, 2002).

Os colágenos são, na maioria das vezes, sintetizados por células que fazem parte do estroma tecidual como fibroblastos, miofibroblastos, osteoblastos e condrócitos. Alguns colágenos são sintetizados por células adjacentes ou que recobrem este estroma (células epiteliais, endoteliais, mesoteliais). Um exemplo típico é o colágeno do tipo IV, o qual é sintetizado cooperativamente por células estromais e células adjacentes ou que recobrem este estroma (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Uma propriedade característica dos vários tipos de colágenos é a de formar polímeros altamente organizados. Os colágenos não fibrilares contêm vários domínios de ligação para colágenos e proteínas não colágenas, os quais permitem a interação entre si e a outros componentes da MEC formando redes de associação insolúveis. Neste fundamento, podemos destacar o componente mais abundante da membrana basal, o colágeno do tipo IV, que contém um domínio não colágeno na porção carboxiterminal (NC1) e um longo domínio em fita tripla helicoidal de 400nm (cauda) com várias pequenas interrupções, conferindo uma certa flexibilidade a esta estrutura (AUMAILLEY; GAYRAUD, 1998). A representação esquemática do colágeno tipo IV e algumas possíveis interações existentes nas membranas basais estão expostas na figura 2.

De acordo com ENGBRING e KLEINMAN (2003) o colágeno tipo IV, presente na matriz extracelular das membranas basais, representa a maior barreira para o extravasamento e a invasão tecidual por células tumorais. Proteínas que degradam esta matriz, como as colagenases, estão diretamente relacionadas com os processos de invasão e proliferação de células tumorais, uma vez que a degradação da membrana basal durante a invasão tumoral nos tecidos libera moléculas ou fragmentos ativos de componentes da MEC. Outras alterações das proteínas da membrana basal podem ser encontradas em amostras patológicas. Segundo EYDEN (1999) uma superexpressão ou a desorganização destas proteínas que compõem a membrana basal podem estar relacionadas com processos biológicos celulares, como a proliferação, migração e diferenciação. Ainda, o decréscimo de colágeno tipo IV na membrana basal juntamente com o aumento na expressão de colagenases tipo IV ocorrem durante a tumorigênese colorretal (ZENG; COHEN; GUILLEM, 1999) e estão relacionados com o comportamento invasivo de glioblastomas humanos (LAKKA *et al.*, 2002).

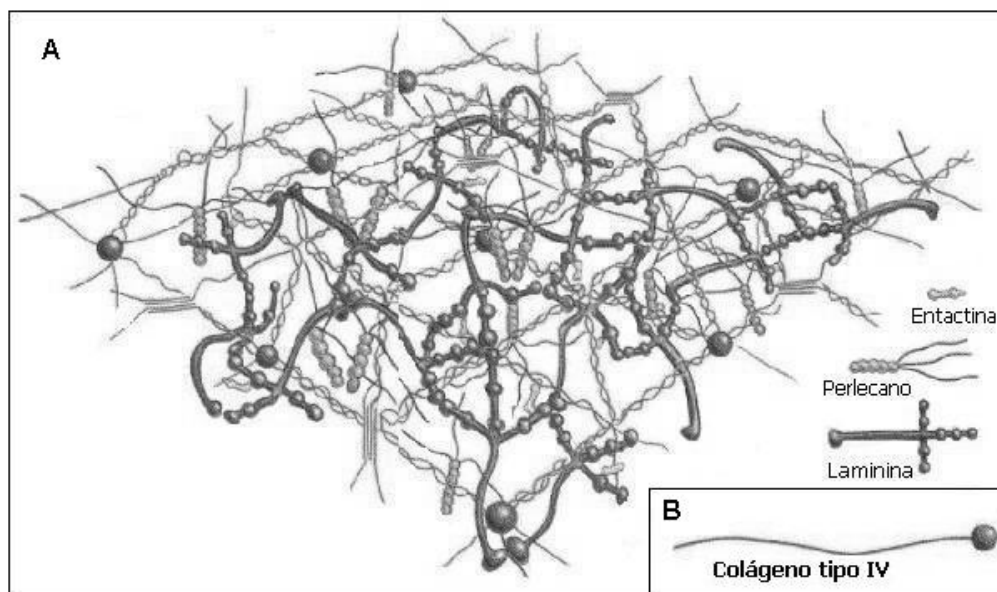


Figura 2. Representação esquemática da molécula de colágeno tipo IV: a linha representa a cauda em fita tripla helicoidal; o círculo representa o domínio não colágeno (B). Modelo da estrutura molecular da membrana basal formada por interações específicas entre as proteínas de colágeno tipo IV, laminina, entactina e o proteoglicano perlecano (A). Extraído e adaptado de ALBERTS *et al.*, 1997.

3.2.2 Laminina

A laminina, junto com o colágeno tipo IV, nidogênio e o proteoglicano perlecano, é um dos principais componentes da membrana basal e representa a mais típica e abundante glicoproteína não colágena presente nesta estrutura (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). A laminina foi descrita primeiramente por TIMPL e colaboradores (1979) quando encontraram no estroma de um tumor de camundongo (o sarcoma EHS) quantidade substancial de um componente não colágeno, componente este que foi purificado, identificado como uma glicoproteína e chamado laminina. Esta glicoproteína era constituída por três cadeias polipeptídicas (α , β e γ) unidas entre si através de pontes dissulfeto e apresentava o formato de uma cruz. Desde então, várias formas isoméricas, que agora formam a família laminina, tem sido descobertas (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000). Até o presente, cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ já foram descritas. Entretanto, somente doze isoformas distintas de laminina já foram isoladas (ENGBRING; KLEINMAN, 2003). Segundo AUMAILLEY e GAYRAUD (1998), devido a dificuldades na purificação destas

proteínas, muitos dados disponíveis são ainda derivados de estudos com a laminina-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), a primeira isoforma identificada (figura 3).

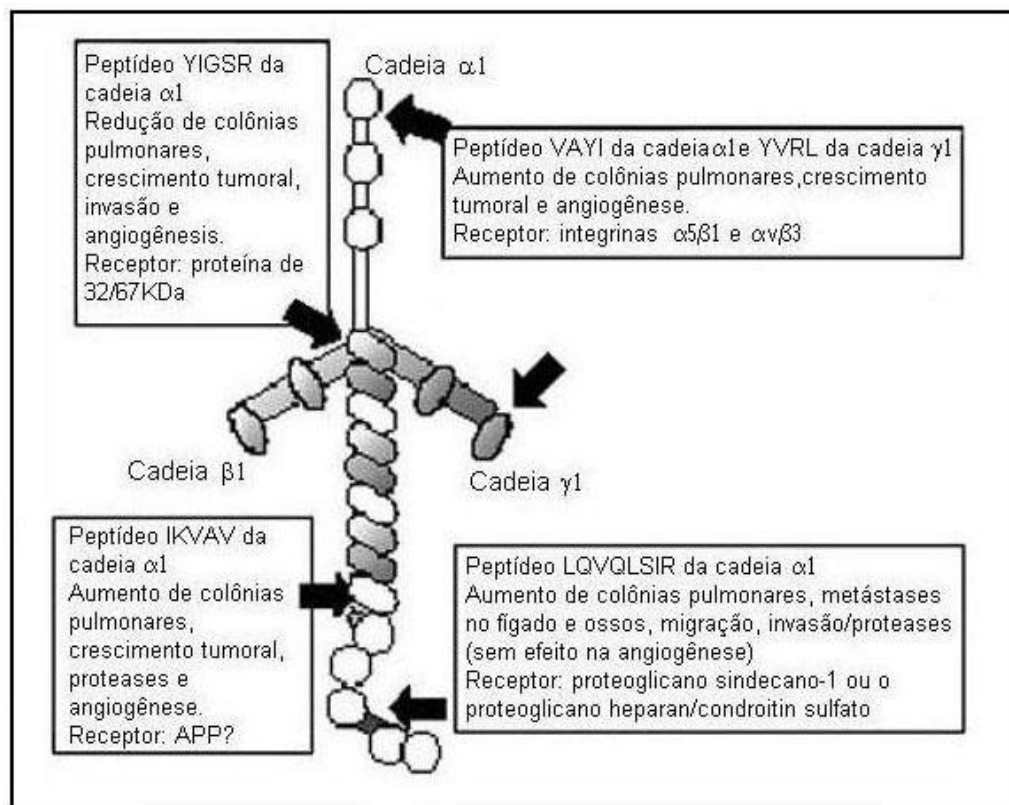


Figura 3. Representação esquemática da laminina-1 mostrando alguns de seus sítios ativos. Extraído e adaptado de ENGBRING e KLEINMAN (2003).

Embora a rede de colágeno tipo IV proporcione estabilidade à membrana basal, a laminina tem um papel essencial na formação desta devido às múltiplas interações consigo mesma e com outros componentes da MEC. Através da interação entre moléculas de laminina formam-se sistemas de redes que, na membrana basal, se associam às redes de colágeno tipo IV através do nidogênio, uma pequena glicoproteína. O nidogênio associado às redes de laminina também é capaz de promover a ligação destas com outros componentes da MEC, como a fibronectina. A laminina-1 ainda apresenta domínios de ligação para a heparina, o qual pode contribuir para a ligação do proteoglicano perlecano, outra molécula abundante na membrana basal e bastante relacionada com processos biológicos celulares (AUMAILLEY; SMYTH, 1998).

As lamininas apresentam uma surpreendente variedade de efeitos sobre as células adjacentes, incluindo adesão, migração e diferenciação celular. Elas exercem seus efeitos principalmente através de seus domínios de ligação com integrinas, predominantemente presentes na cadeia α (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). O principal papel das lamininas parece ser a mediação da interação entre células e demais componentes da matriz extracelular, notadamente na membrana basal (AUMAILLEY; SMYTH, 1998). Algumas destas interações estão envolvidas na modulação de funções específicas. A laminina 1, por exemplo, induz a diferenciação de células epiteliais e a laminina-2 promove o crescimento de neuritos em células neurais. A laminina-5 mostra-se envolvida nos processos de adesão e migração celular, sendo sua função dependente de processo proteolítico por metaloproteinases de matriz (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Levando-se em consideração este amplo papel das lamininas na estrutura dos tecidos e na função celular, não é surpresa que estas glicoproteínas estejam significativamente envolvidas numa variedade de processos patológicos. O papel das lamininas nos processos de adesão, migração e proliferação celular, crescimento, invasão e metástases tumorais e na angiogênese tem sido intensamente estudado. Estes estudos tem mostrado que a desregulação na interação entre células tumorais e a matriz extracelular é acompanhada por sua síntese aberrante, pela composição de suas cadeias e por modificações proteolíticas (PATARROYO; TRYGGVASON; VIRTANEN, 2002).

Alguns sítios ativos da laminina-1 com várias atividades biológicas tem sido identificados usando fragmentos proteolíticos, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos. Estes sítios ativos tem sido relacionados com a promoção do fenótipo maligno e a regulação da angiogênese (ENGBRING; KLEINMAN, 2003). Alguns destes sítios ativos e suas relações com a biologia das células tumorais e angiogênese estão descritos na figura 3.

Mais de 20 receptores de superfície celular foram identificados para a laminina, incluindo integrinas, uma proteína de 32/67KDa, proteoglicanos, gangliosídeos, sulfatídeos, lectinas e galactosiltransferases. Entretanto, a especificidade da resposta celular é dependente do tipo celular, do receptor, da

isoforma de laminina e de suas interações dentro do estroma tecidual (ENGBRING; KLEINMAN, 2003).

3.3.3 Fibronectina

A fibronectina é uma das proteínas mais caracterizadas da matriz extracelular. Consiste em uma glicoproteína dimérica que apresenta duas subunidades bastante semelhantes de aproximadamente 250KDa covalentemente ligadas na região carboxi-terminal por um par de ligações dissulfeto. Esta molécula é composta por uma série de domínios polipeptídicos repetitivos conhecidos como tipos I, II e III (figura 4). Estas unidades repetitivas contêm regiões ou domínios que interagem com uma variedade de outras moléculas (tabela 1)(ROMBERGER, 1997).

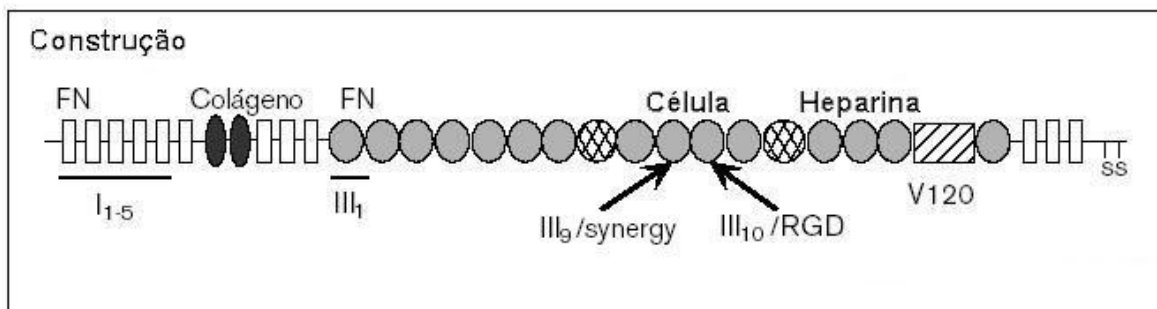


Figura 4. Domínios estruturais da fibronectina. O dímero da fibronectina é formado através de ligações dissulfeto intercadeia na região carboxi-terminal (SS). Cada subunidade consiste em unidades repetitivas do tipo I (□), tipo II (●) e tipo III (○). Agrupamentos de unidades repetitivas formam domínios para a interação com células, outros componentes da matriz e a própria fibronectina. A unidade repetitiva I₁₋₅ forma um domínio de ligação para a própria fibronectina (FN). Juntas, a seqüência RGD na repetição III₁₀ e o sítio de sinergismo na III₉ cooperam para a máxima ligação à matriz via integrina $\alpha_5\beta_1$. Alternativamente os segmentos EIIIB e EIIIA (⊗) e a região V120 (▨) flanqueiam os domínios de ligação para célula e heparina, respectivamente. Extraído e adaptado de SCHWARZBAUER e SECHLER (1999).

Segundo ARMSTRONG e ARMSTRONG (2000), a fibronectina é bastante encontrada na MEC de vários tecidos e, nesta situação, representa uma proteína insolúvel que pode estar intensamente unida entre si e com outros componentes do estroma tecidual. Além do mais, a fibronectina está presente em grandes concentrações no plasma e outros fluídos corporais como uma proteína solúvel. Ambas as formas da fibronectina foram inicialmente identificadas como proteínas que promovem a adesão celular sobre substratos artificiais e de colágeno.

A fibronectina é codificada por um único gene onde existem éxons repetidos que correspondem às unidades repetitivas tipo I, II e III. Embora seja produto de um único gene, podem existir até 20 isoformas da fibronectina na espécie humana, resultado de *splicing* alternativo de um pré-mRNA. Estas fibronectinas com diferentes propriedades fornecem às células mecanismos precisos para alterar a composição da MEC de maneira específica para cada tecido (PANKOV e YAMADA, 2002).

Tabela 1. Domínios de ligação da fibronectina e seus significados funcionais. Adaptado de ROMBERGER (1997).

Domínio Amino-terminal	
Liga:	fibrina gangliosídeos trombospondina heparina (baixa afinidade)
Função:	região complementar da FN na região carboxi-terminal associação da MEC
Domínio de ligação ao Colágeno	
Liga:	colágenos gelatina (colágeno desnaturado) C1q
Domínio de ligação à Célula	
Liga:	integrinas $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_3\beta_1$
Função:	adesão celular (contém domínios RGD e de sinergismo) associação da MEC
Domínio de ligação à Heparina	
Liga:	heparina (alta afinidade) proteoglicano condroitin sulfato
Função:	promove migração celular
Domínio Carboxi-terminal	
Liga:	fibrina Integrina $\alpha_4\beta_1$
Função:	adesão celular

De acordo com ROMBERGER (1997), a fibronectina está envolvida em muitos processos celulares como adesão, migração, diferenciação/transformação e proliferação. O estudo da ligação entre célula e fibronectina através de seu domínio RGD e seu receptor clássico, a integrina $\alpha_5\beta_1$ tem contribuído notavelmente para os conceitos correntes sobre a adesão celular. Esta integrina participa da incorporação de fibronectina na MEC e a expressão aberrante desta integrina tem sido associada com a tumorigenicidade celular. Ainda, ZHANG, VOURI e RUOSLAHTI (1995), demonstraram que a interação entre a fibronectina e a integrina $\alpha_5\beta_1$ pode suprimir a apoptose.

Além de seu efeito notável sobre a adesão celular, as fibronectinas são geralmente muito usadas durante a embriogênese nos processos de migração celular, tendem a diminuir de acordo com o desenvolvimento tecidual e são aumentadas durante a reparação tecidual e em associação com malignidades (FRENCH-CONSTANT, 1995). Segundo FRANKE e colaboradores (2003), a fibronectina está envolvida na neovascularização tumoral e metástase, previne apoptose e é considerada como imunossupressora. Partindo destes achados, novas possibilidades de tratamento podem ser desenvolvidas, uma vez que existem muitos agentes conhecidos que antagonizam os mecanismos de expressão da fibronectina.

3.3.4 Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PGs) são moléculas constituídas por um corpo protéico, rico em resíduos de treonina e serina, ao qual estão ligados covalentemente uma série de cadeias de glicosaminoglicanos (figura 5). Estes glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídicas compostas por um ácido urônico ou uma D-galactose ligada através de uma ligação O-glicosídica a uma hexosamina. A maioria dos GAGs são sulfatados em diversas posições, conferindo uma alta densidade aniônica a este polímero (SCOTT-BURDEN, 1994).

Os PGs podem ser encontrados na superfície celular, no interior da célula em grânulos secretórios ou na MEC (NADER, 1991). Já foi demonstrado que os PGs da superfície celular participam tanto do reconhecimento quanto da ligação à citocinas (CONGET; MINGUELL, 1994); suas cadeias de GAGs carregadas negativamente podem interagir com moléculas da MEC e vários fatores de crescimento, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), promovendo a ativação da proliferação e agregação celular (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). A própria síntese dos PGs pode estar sob o controle de citocinas específicas, que por sua vez, podem aumentar a expressão destes PGs na superfície celular, promovendo maior adesão de células neoplásicas aos componentes da MEC, tal como a fibronectina (CONGET; MINGUELL, 1994).

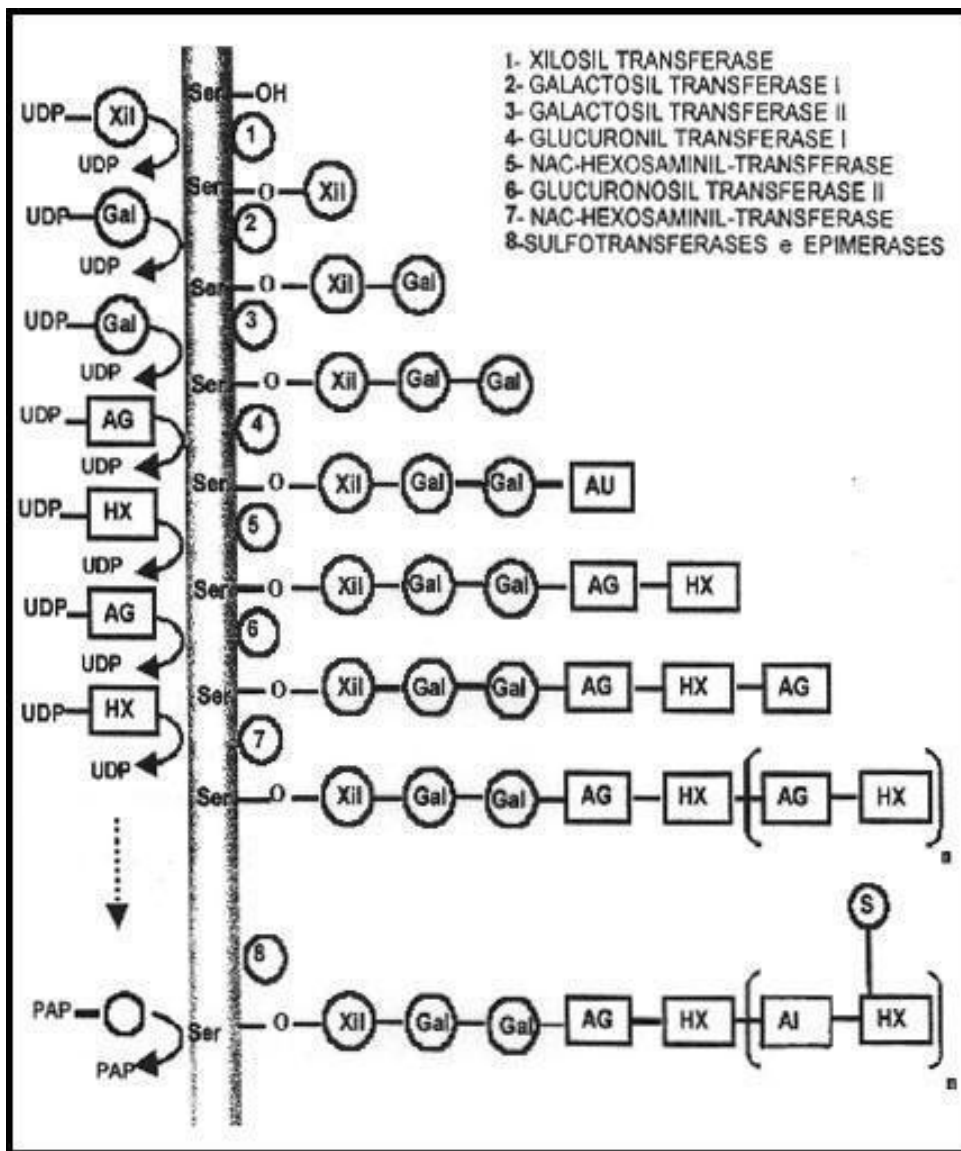


Figura 5. Estrutura dos proteoglicanos demonstrando os passos de ligação das cadeias de GAGs. Extraído de NADER (1991).

A interação com outras moléculas e o controle da atividade destas, determinam variadas atividades fisiológicas aos PGs e seus GAGs, como atividade anticoagulante, regulação das interações célula-célula e célula-matriz extracelular, proliferação celular, diferenciação e regeneração, influência sobre eventos celulares e expressão de proteínas, crescimento tumoral, angiogênese e metástase (VOLPI *et al.*, 1994).

Evidências indicam que mudanças significativas na quantidade de proteoglicanos ocorrem no estroma tumoral e estas alterações podem estar relacionadas à progressão e invasão tumoral (IOZZO; COHEN, 1993). Ainda, tem sido demonstrado, *in vitro*, que GAGs altamente sulfatados estimulam a invasão de células de melanoma (BRUNNER *et al.*, 1998). Estudos realizados através de

alterações promovidas durante a síntese de proteoglicanos tem demonstrado seu efeito na biologia de células tumorais. ALVAREZ-SILVA e TRENTIN (1996), demonstraram que a subsulfatação dos GAGs, promovida pelo tratamento com clorato de sódio, reduziu a proliferação de células leucêmicas WeHi-3B. MENDES DE AGUIAR e colaboradores (2002), novamente com o uso do clorato de sódio, verificaram uma inibição da proliferação de células de glioma C6 e uma redução da adesão destas células a proteínas da matriz extracelular. A utilização de outras moléculas que alteram a síntese dos PGs, como os xilopiranosídeos, tem sido relacionadas com a redução da adesão e proliferação celular. Segundo GORDON, ZANGER e HATCHER (1986), esta redução da adesão celular pode estar relacionada com a depleção da comunicação dos PGs de superfície celular com moléculas presentes no microambiente extracelular. De acordo com KOLSET e colaboradores (1990), o tratamento com β -xilósídeos pode promover uma elevada expressão de cadeias de GAGs, o que poderia inibir interações com fatores fundamentais para a regulação da proliferação celular.

O papel da matriz extracelular sobre a modulação de processos celulares tem sido constantemente estudado e há crescentes evidências que células tumorais, assim como células normais, têm sua sobrevivência dependente de sinais derivados de um microambiente extracelular especializado.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT); Albumina sérica bovina (BSA), Azul de Trypan, Bálsamo do Canadá, Clorato de sódio, Hematoxilina, Metil β -D-xilopiranosídeo, SIGMA.

Anticorpo monoclonal anti-laminina humana, Anticorpo policlonal anti-fibronectina humana, Anticorpo monoclonal anti-colágeno IV, Cromógeno DAB líquido, Sistema LSAB+, Solução de reativação antigênica, DAKO.

Cloreto de sódio, Colágeno tipo IV de camundongo, Fibronectina de plasma humano, Fosfato de potássio monobásico, Fosfato de sódio dibásico, Laminina natural de camundongo, Meio de cultura Iscove modificado por Dulbecco (IMDM), GIBCO.

Dodecil sulfato de sódio (SDS), AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH.

Garrafas de cultura 25cm², Placas de cultura de 96 poços e de 12 poços, TPP.

Metanol, REAGEN.

Peróxido de hidrogênio, Bicarbonato de sódio, MERCK.

Soro bovino fetal (SBF), CULTILAB.

4.2 EQUIPAMENTOS

Agitador magnético Q-221-2 – QUIMIS; Banho Maria dbm 120 – BENFER; Balança Analítica AB 204 – METTLER TOLEDO; Centrífuga – CONTINENTAL VI; Centrífuga 5415 D – EPPENDORF; Câmara de Neubauer – HIRSCHMANN TECHCOLOR; Espectrofotômetro Ultrospec 3000 – PHARMACIA BIOTECH; Estufa úmida de CO₂ – NUAIRE; Fluxo laminar – VECO; Microscópio óptico – OLYMPUS; Microscópio óptico Labophot – NIKON; Micrótopo RM 2045 – LEICA; pHmetro TM 38 – SENSORTECHNIK MEINSBERG GMBH; Videocâmara VK-C150 – Hitachi.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de linfoma humano U-937 obtida do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ). Esta linhagem foi originalmente obtida a partir da efusão pleural de um paciente (homem caucasiano de 37 anos) com linfoma histiocítico (SUNDSTROM & NILSSON, 1976). A linhagem U-937 foi mantida em ambiente estéril, plaqueada a uma densidade de 10^5 células por garrafa de cultura de 25cm^2 e cultivada em 5mL de meio de cultura Iscove modificado por Dulbecco (IMDM) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) por um período aproximado de 48 horas. As células foram manipuladas em capela de fluxo laminar e mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO_2 a 37°C . Após as 48 horas em cultura as células foram retiradas das garrafas, lavadas com PBS e contadas em câmara de Neubauer. Cem mil (10^5) células foram replaqueadas em garrafas de cultura e as demais células obtidas foram destinadas à experimentação.

4.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM CLORATO DE SÓDIO OU β -XILOSÍDEO

As células U-937 foram cultivadas como descrito anteriormente e tratadas com 10mM de clorato de sódio ou com 1mM de metil β -D-xilopiranosídeo (β -xilósídeo) dissolvidos ao meio de cultura, durante 48 horas. Após este período as células foram destinadas à experimentação, permanecendo sob condições de tratamento.

4.5 PREPARO DAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Proteínas constituintes da matriz extracelular (MEC) como fibronectina (FN), laminina (LN) ou colágeno tipo IV (COL IV) foram adquiridas comercialmente e diluídas a uma concentração de $20\mu\text{g/ml}$. A fibronectina e o colágeno tipo IV foram diluídos em PBS pH 7,4. A laminina foi diluída em tampão acetato pH 4,0

acrescido de 2mM de CaCl_2 a uma concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ (CHENG *et al.*, 1997; FREIRE & COELHO-SAMPAIO, 2000). As concentrações de proteínas da MEC e os diluentes utilizados foram pré-definidos utilizando ensaios de adesão, proliferação e imunofluorescência (dados não demonstrados). Após a aplicação das determinadas soluções nas placas de cultura, estas foram mantidas a 4°C por 12 horas. Após este período o sobrenadante foi removido, as placas foram lavadas com PBS e as células plaqueadas de forma adequada a cada experimento. Como controle foi utilizada albumina sérica bovina (BSA).

4.6 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR – MÉTODO DO MTT

A capacidade de adesão das células leucêmicas U-937 às diferentes moléculas da MEC foi testada utilizando o método do MTT descrito por MOSSMANN (1983). As células foram plaqueadas a uma densidade de 10⁵ células/cm² em placas de 96 poços previamente revestidas com FN, LN, COL IV ou BSA. As células foram mantidas em condições de cultivo durante 4 horas. Ao final deste tempo, os poços foram lavados com PBS para remoção das células não aderentes, em seguida foi adicionado 10 μl /poço de 2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT, 5mg/mL) e a placa incubada por mais 4 horas nas condições de cultivo. Nas células viáveis, as desidrogenases mitocondriais reduzem o MTT, produzindo um precipitado colorido que foi dissolvido pela adição de SDS a 10% durante 12 horas, a 37°C. A coloração foi quantificada por leitura da absorbância a 540nm. Os valores de absorbância são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis aderidas.

4.7 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR – CONTAGEM DE CÉLULAS

A capacidade de adesão das células leucêmicas U-937 às diferentes moléculas da MEC foi também estimada através da contagem de células. As células foram plaqueadas a uma densidade de 10⁵ células/cm² em placas de 12 poços previamente revestidas com FN, LN, COL IV ou BSA. As células foram mantidas em condições de cultivo durante 4 horas. Ao final deste tempo, os poços

foram lavados com PBS para remoção das células não aderentes e em seguida foi adicionado 1mL/poço de uma solução de azul de Trypan (0,4%). O azul de Trypan é um corante vital que é absorvido apenas por células mortas que aparecem azuis ao microscópio de luz, enquanto que as células viáveis excluem ativamente este corante e aparecem refringentes. As células aderidas ao fundo da placa foram contadas utilizando-se microscópio de luz invertido.

4.8 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – MÉTODO DO MTT

A influência das moléculas de MEC sob a proliferação do linfoma U-937 foi testada pelo método do MTT e por contagem direta de células (descrito a seguir). Nos experimentos realizados com o MTT foram utilizadas duas formas de controle. A primeira, utilizada também em praticamente todos os experimentos, consiste na célula cultivada sobre albumina sérica bovina (BSA); a segunda foi realizada com o objetivo de assegurar que as medidas realizadas eram realmente de proliferação celular. Para isto, em um grupo foram realizadas leituras poucos minutos após o plaqueamento das células sobre as moléculas de MEC, tendo desta forma um valor correspondente ao número inicial de células utilizadas no experimento. Este dado possibilita a identificação de morte celular nos demais grupos.

Para estes ensaios foram utilizadas placas de 96 poços previamente incubados com proteínas de MEC. As células U-937 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^3 células/cm² e incubadas em intervalos de 24hs, 48hs, 72hs e 96hs nas condições de cultivo. Ao final de cada tempo, foram adicionados 10µl/poço de 2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT, 5mg/mL) e a placa incubada por 4 horas nas condições de cultivo. Em seguida foi adicionado SDS a 10% durante 12 horas, a 37°C. A coloração foi quantificada por leitura da absorbância a 540nm.

4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – CONTAGEM DE CÉLULAS

A proliferação celular foi também estimada através da contagem direta das células. Para estes ensaios foram utilizadas placas de 12 poços previamente incubados com proteínas de MEC. As células U-937 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^3 células/cm² e incubadas em intervalos de 24hs, 48hs, 72hs e 96hs nas condições de cultivo. Ao final de cada tempo, o meio de cultura contendo as células foi retirado dos poços e estas foram contadas em câmara de Neubauer utilizando-se o método de contagem com azul de Trypan.

4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados para análise da deposição e organização de moléculas da MEC (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) em linfonodos humanos (normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro). Foram realizados cortes histológicos de 2 µm de espessura em lâminas silanadas de amostras de linfonodos previamente inclusos em parafina. Estas amostras foram obtidas no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC. Os cortes histológicos foram desparafinados, diafanizados e a peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão das lâminas em uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 30%. Os cortes foram então submetidos à reativação antigênica utilizando-se a solução de reativação antigênica DAKO e seu protocolo de uso. Após estes procedimentos os cortes foram lavados em PBS e incubados com os anticorpos primários durante uma hora, em câmara úmida e à temperatura ambiente, como segue: anticorpo anti-laminina 1:300; anticorpo anti-fibronectina 1:500; anticorpo anti-colágeno IV 1:300. Após novas lavagens com PBS, os cortes foram então incubados em câmara úmida com o sistema LSAB+™ (DAKO) durante 30 minutos à temperatura ambiente. A revelação procedeu-se através da adição do cromógeno DAB líquido seguido de contra coloração com Hematoxilina e montagem permanente das lâminas com Bálsamo do Canadá. As lâminas foram então analisadas por microscopia de luz e capturadas através de videocâmara.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se o programa GraphPad Prism 3. A significância dos mesmos foi verificada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Pearson. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DOS LINFONODOS

A observação dos cortes histológicos dos linfonodos tem por finalidade principal avaliar semiquantitativamente a deposição global das proteínas da MEC (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) e a arquitetura das mesmas. Os linfonodos avaliados (um linfonodo normal e um linfonodo infiltrado pelo linfoma histiocítico verdadeiro) apresentaram dois padrões bastante distintos: com características normais, sem alterações de celularidade e deposição de moléculas de matriz extracelular; e com comprometimento a partir da invasão por células neoplásicas, ou seja, células grandes, com núcleos polimórficos, de cromatina grosseira e com um ou mais nucléolos. Este linfonodo comprometido foi avaliado pelo laboratório de hemopatologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) no ano de 2000 e diagnosticado, através de achados imunofenotípicos, imunohistoquímicos e morfológicos, como um linfoma histiocítico verdadeiro.

As imagens obtidas (Figuras 6 a 11) representam a porção cortical dos linfonodos aparecendo em sua porção mais superior parte da cápsula destes (porção periférica do linfonodo, podendo estar recoberta por tecido adiposo). A análise em microscopia de luz dos cortes contracolorados com hematoxilina (coloração azul) evidencia a diferença morfológica existente na porção cortical do linfonodo normal, o qual apresenta células menores com núcleos mais arredondados, e do linfonodo comprometido, com células maiores, núcleos polimórficos e algumas figuras de mitose. As marcações que aparecem em marrom, bem visíveis na cápsula dos linfonodos, circundando o núcleo das células ou formando fibras que se projetam para o interior do tecido, representam colorações específicas para as proteínas da MEC laminina, fibronectina ou colágeno tipo IV.

5.1.1 Avaliação da deposição de laminina nos linfonodos normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro

A figura 6 representa o corte histológico de um linfonodo normal, onde se pode observar a presença da proteína laminina distribuída pela cápsula e córtex

de maneira uniforme, apresentando marcação mais acentuada para endotélio vascular (seta vermelha).

A análise comparativa da figura 7, que representa um corte histológico do linfonodo comprometido pelo linfoma histiocítico, mostra que a proteína laminina está mais restrita à cápsula do linfonodo, aparecendo mais pontualmente na região cortical deste, apresentando uma redução de suas fibras quando comparado ao linfonodo normal.

5.1.2 Avaliação da deposição de fibronectina nos linfonodos normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro

A proteína da MEC fibronectina aparece em grande parte restrita à cápsula do linfonodo normal, com pequena marcação na região cortical (Figura 8). Quando comparada ao linfonodo comprometido pelo linfoma histiocítico observa-se ainda uma grande marcação na cápsula linfonodal, porém com deposição bastante pronunciada na região cortical do linfonodo (Figura 9). Este aumento na deposição de fibronectina pode ser visualizado através da formação de fibras reticulares que circundam as células da região cortical do linfonodo comprometido pelo linfoma histiocítico.

5.1.3 Avaliação da deposição de colágeno tipo IV nos linfonodos normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro

Na figura 10 se pode observar o padrão de deposição do colágeno tipo IV no linfonodo normal, onde há intensa marcação para esta proteína na região capsular e uma marcação mais esparsa, de forma reticular, no córtex linfonodal. Comparativamente, observa-se na figura 11, que representa um corte histológico do linfonodo comprometido pelo linfoma histiocítico, que a marcação para esta proteína tende a diminuir na região capsular. Entretanto, na região cortical, observam-se fibras mais alongadas e paralelas à cápsula do linfonodo comprometido, mas que não necessariamente representam um aumento na deposição desta proteína.

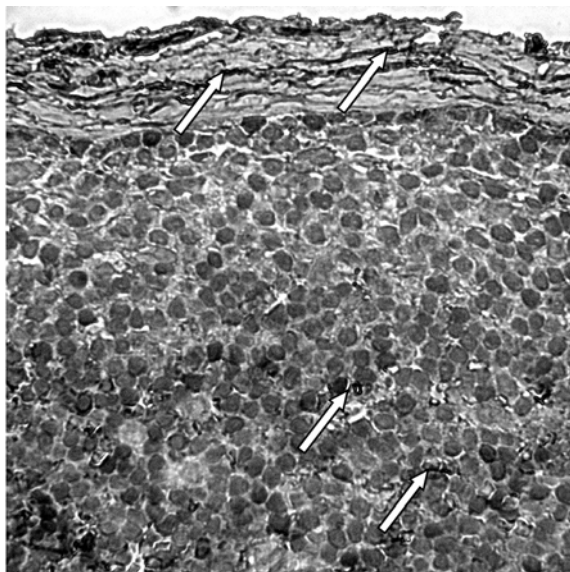


Figura 6. Corte histológico de linfonodo humano normal. As setas indicam a deposição de laminina na cápsula e no córtex do linfonodo. Os cortes foram contracolorados pela hematoxilina (aumento de 400x).

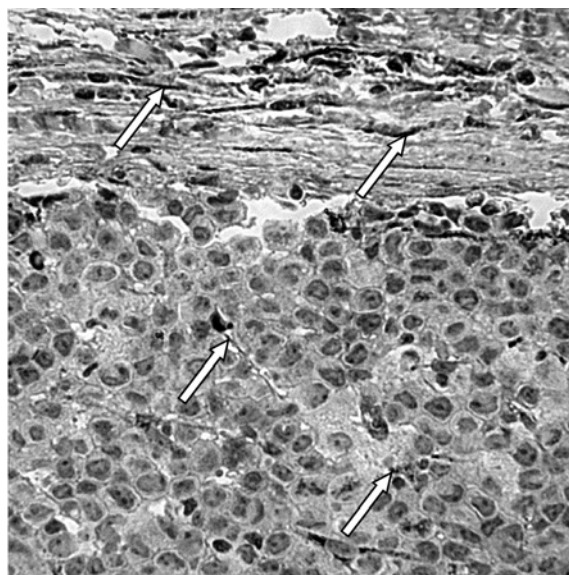


Figura 7. Corte histológico de linfonodo humano comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro. As setas indicam a deposição de laminina na cápsula e no córtex do linfonodo. Os cortes foram contracolorados pela hematoxilina (aumento de 400x).

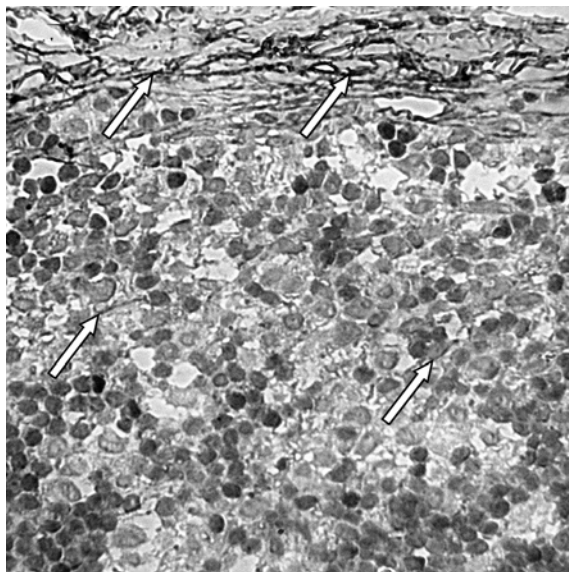


Figura 8. Corte histológico de linfonodo humano normal. As setas indicam a deposição de colágeno tipo IV na cápsula e no córtex do linfonodo. Os cortes foram contraincolorados pela hematoxilina (aumento de 400x).

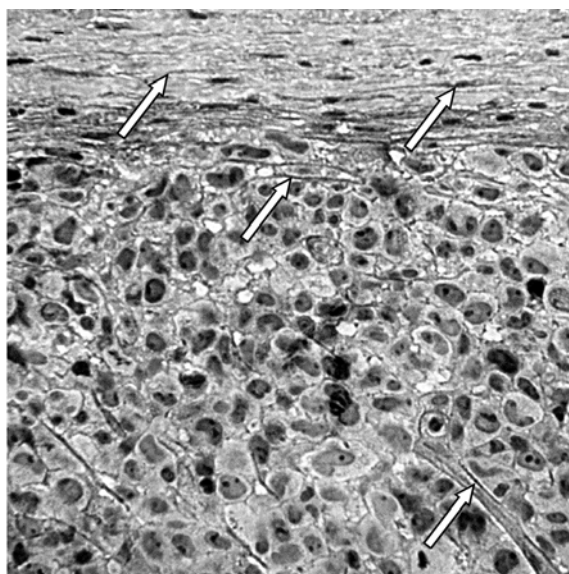


Figura 9. Corte histológico de linfonodo humano comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro. As setas indicam a deposição de colágeno tipo IV na cápsula e no córtex do linfonodo. Os cortes foram contraincolorados pela hematoxilina (aumento de 400x).

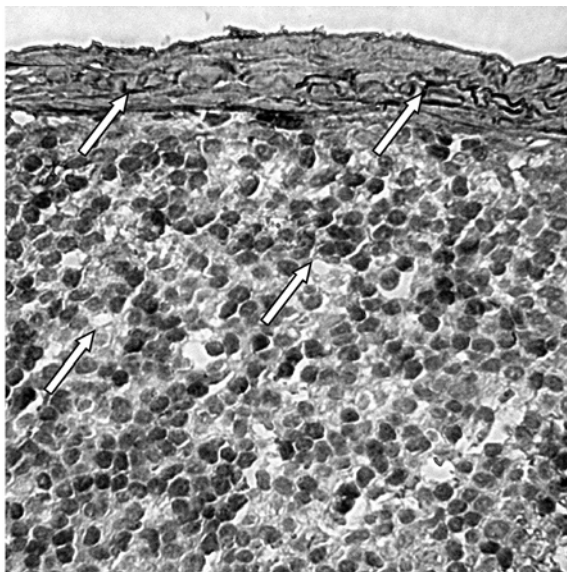


Figura 10. Corte histológico de linfonodo humano normal. As setas indicam a deposição de fibronectina na cápsula e no córtex do linfonodo. Os cortes foram contracolorados pela hematoxilina (aumento de 400x).

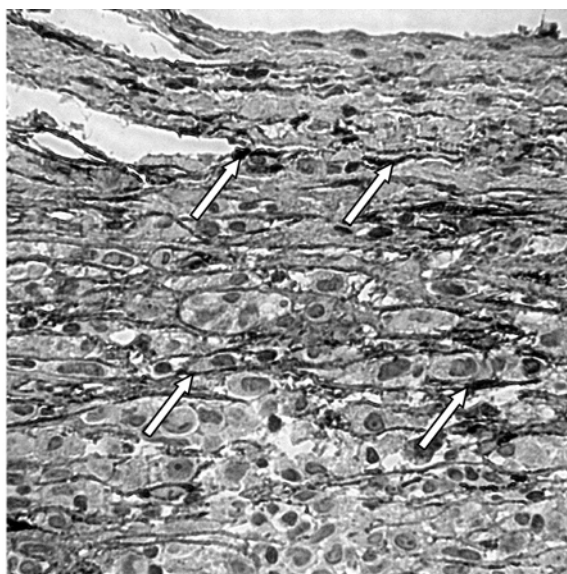


Figura 11. Corte histológico de linfonodo humano comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro. As setas indicam a deposição de fibronectina na cápsula e no córtex do linfonodo. Os cortes foram contracolorados pela hematoxilina (aumento de 400x).

5.2 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR SOBRE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

A adesão da linhagem U-937 às proteínas da matriz extracelular (MEC) foi avaliada através do método do MTT e por contagem de células. Os valores expressos pela adesão das células U-937 aos substratos de laminina, fibronectina ou colágeno tipo IV através do método do MTT estão demonstrados na figura 12, onde se pode observar um aumento da adesão celular de aproximadamente 50% para as células cultivadas sobre o substrato de fibronectina em relação às células cultivadas sobre o substrato controle (BSA). De maneira inversa, a linhagem celular U-937 apresentou uma adesão bastante reduzida aos substratos compostos por laminina ou colágeno tipo IV, adesão esta, de aproximadamente 35% e 45 % respectivamente menores que a adesão promovida pelo substrato controle (Figura 12).

Os resultados da adesão celular obtidos através da contagem das células aderidas, estão perfilados na figura 13, onde se pode observar novamente a maior adesão desta linhagem celular ao substrato composto por fibronectina, cerca de 150% maior que a adesão ao substrato controle (BSA). Os substratos compostos por laminina ou colágeno tipo IV, que promoveram uma menor adesão desta linhagem celular, não foram estatisticamente diferentes da adesão promovida pelo substrato controle através deste método de avaliação (Figura 13).

Através da utilização do método estatístico de Pearson, se constata a correlação existente entre os resultados obtidos para a adesão celular através dos dois métodos de avaliação empregados, com coeficiente de correlação estimado em 0,9852 ($p < 0,01$).

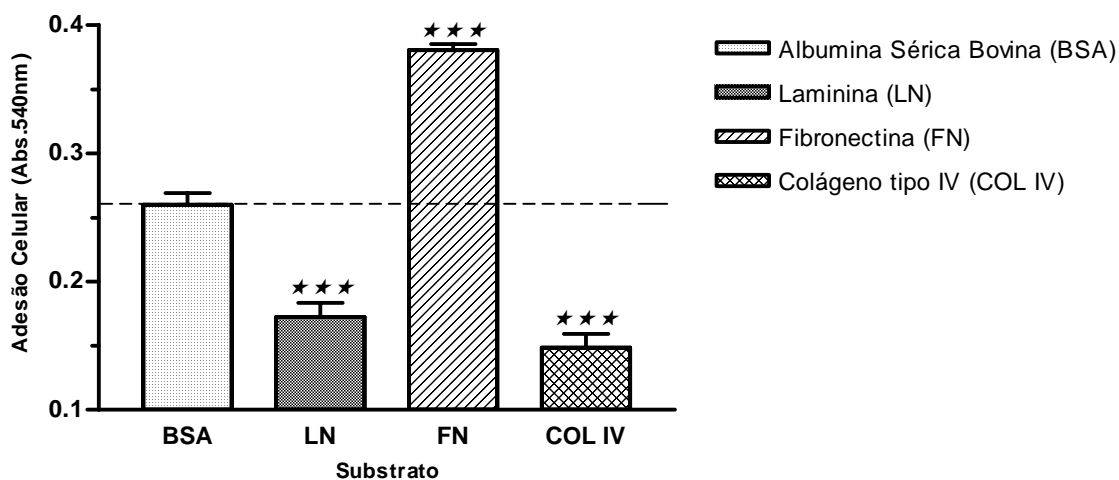


Figura 12. Perfil de adesão das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado através do método do MTT. Os resultados representam valores médios de 4 experimentos, processados em quadruplicata, e as barras verticais o desvio padrão, considerando-se: *** $p < 0,001$.

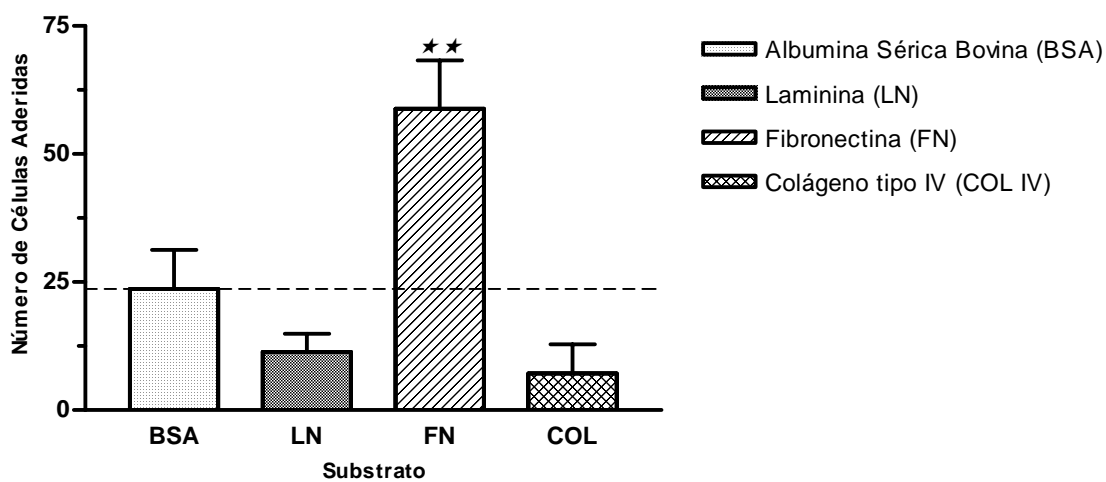


Figura 13. Perfil de adesão das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado através da contagem das células aderidas. Os resultados representam valores médios de 4 experimentos, processados em quadruplicata, e as barras verticais o desvio padrão, considerando-se: ** $p < 0,01$.

5.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR SOBRE PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

A proliferação da linhagem U-937 sobre as proteínas da matriz extracelular (MEC) também foi avaliada através do método do MTT e por contagem de células. Os resultados, expressos por absorbância para o método do MTT, estão representados na figura 14, enquanto que os resultados do método de contagem de células estão representados na figura 15. Estes resultados foram estimados através da contagem do número de células em Câmara de Neubauer e expressam o número de células $\times 10^4$ por mililitro de meio de cultura. O controle dos experimentos foi obtido pela proliferação celular sobre um substrato composto por albumina sérica bovina (BSA).

Como pode ser observado na figura 14, a linhagem celular U-937 apresenta uma maior proliferação sobre o substrato composto por fibronectina para todos os tempos testados. Para as primeiras 24 horas de cultura, as células cultivadas sobre fibronectina proliferaram cerca de 49% a mais que aquelas cultivadas sobre albumina sérica bovina (BSA), entretanto este aumento de proliferação não foi considerado estatisticamente significativo devido ao elevado desvio padrão obtido para o substrato controle (BSA). Para as células cultivadas por 48, 72 e 96 horas, a proliferação celular sobre o substrato composto por fibronectina foi de aproximadamente 25%, 42% e 30% respectivamente maior que o controle (BSA). As células cultivadas sobre os substratos compostos por laminina ou colágeno tipo IV obtiveram taxas de proliferação muito próximas àquelas promovidas pelo substrato controle (BSA) para todos os tempos de cultivo testados.

Os resultados da proliferação celular, obtidas através da contagem de células (Figura 15) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas nas taxas de proliferação da linhagem U-937 sobre os diferentes substratos para todos os períodos de tempo avaliados. Também não foi possível estabelecer quaisquer correlações entre os resultados obtidos através do método do MTT e do método de contagem de células para a proliferação desta linhagem celular.

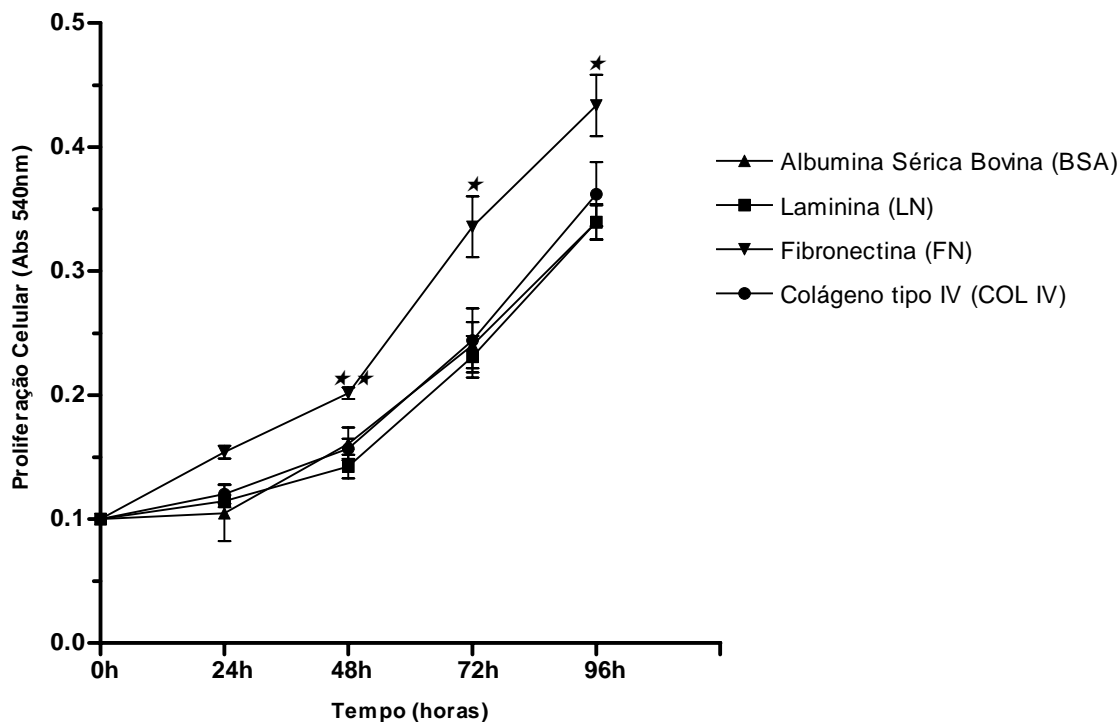


Figura 14. Perfil de proliferação das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado pelo método do MTT. Os resultados representam valores médios de 5 experimentos, processados em quadruplicata, e as barras verticais o desvio padrão, considerando-se: ★ $p < 0,05$ e ★★ $p < 0,01$.

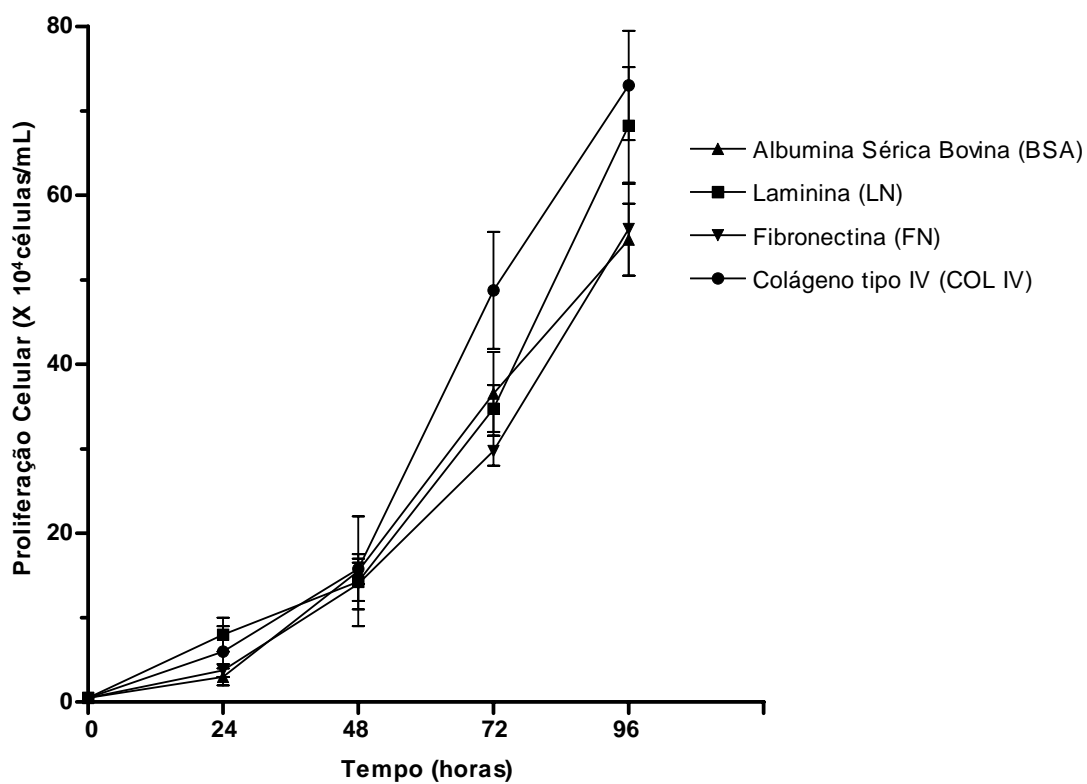


Figura 15. Perfil de proliferação das células U-937 sobre proteínas da matriz extracelular avaliado através da contagem das células em câmara de Neubauer. Os resultados representam valores médios de 5 experimentos, processados em quadruplicata, e as barras verticais o desvio padrão.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORATO DE SÓDIO OU DO β -XILOSÍDEO SOBRE A ADESÃO CELULAR EM FIBRONECTINA

O substrato composto por fibronectina promoveu uma grande adesão das células U-937 quando comparado ao substrato controle (BSA). Como pode ser observado na figura 16, o tratamento das células U-937 com 10mM de clorato de sódio ou com 1mM de β -xilósídeo não alterou o padrão de adesão destas células ao substrato de fibronectina.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORATO DE SÓDIO E DO β -XILOSÍDEO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FIBRONECTINA

Durante 48 horas em cultura, a proliferação das células U-937 sobre o substrato composto por fibronectina foi cerca de 45% maior que a proliferação destas células sobre o substrato controle (BSA). Quando estas células foram tratadas com 10mM de clorato de sódio, a proliferação celular teve um decréscimo de aproximadamente 20% em relação às células cultivadas em condições controle sobre a fibronectina. Entretanto, a taxa de proliferação destas células tratados com clorato de sódio ainda foi cerca de 15% maior do que a taxa de proliferação das células cultivadas sobre o substrato controle composto por BSA. As células cultivadas na presença de 1mM de β -xilósídeo obtiveram uma taxa de proliferação de aproximadamente 40% menor que aquelas cultivadas sobre fibronectina nas condições controle. Além disso, a taxa de proliferação destas células foi menor do que aquelas cultivadas sobre o substrato de BSA nas condições controle (Figura 17).

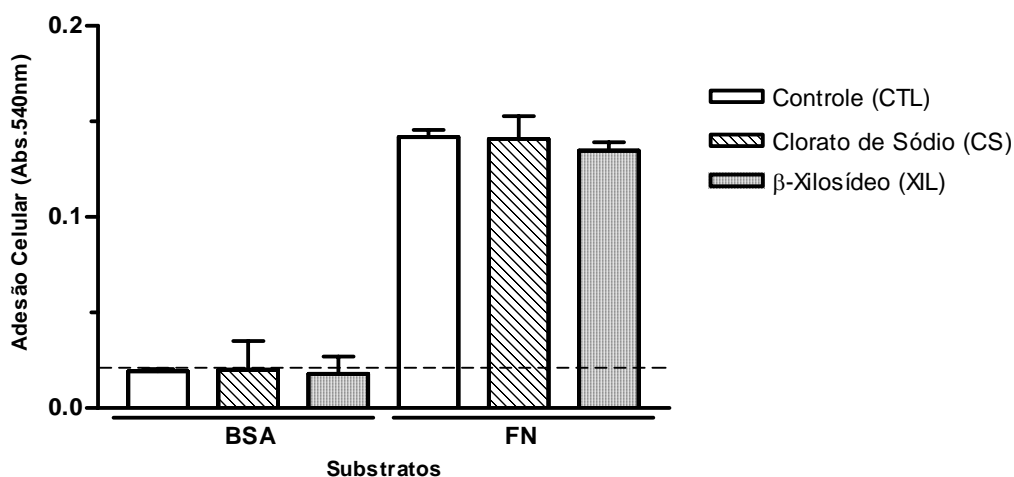


Figura 16. Perfil de adesão das células U-937 nas condições controle, tratadas com 10mM de clorato de sódio ou tratadas com 1mM de β -xilósídeo sobre substratos compostos por albumina sérica bovina (BSA) ou fibronectina (FN) – revelação através do método do MTT. Os resultados representam valores médios de 2 experimentos, processados em quadruplicata, e as barras verticais o desvio padrão.

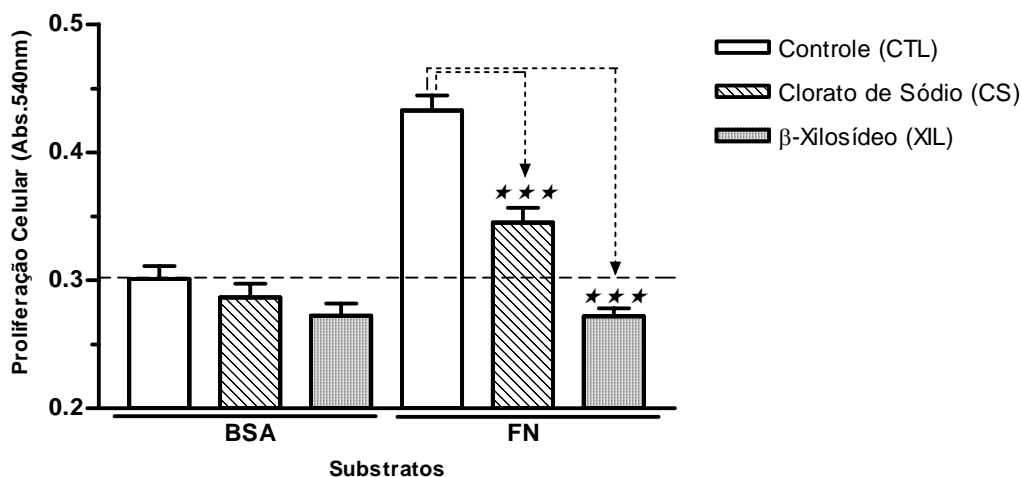


Figura 17. Perfil de proliferação das células U-937 nas condições controle, tratadas com 10mM de clorato de sódio ou tratadas com 1mM de β -xilósídeo sobre substratos compostos por albumina sérica bovina (BSA) ou fibronectina (FN) após 48 horas em cultura (revelação através do método do MTT). Os resultados representam valores médios de 2 experimentos, processados em quadruplicata, e as barras verticais o desvio padrão, considerando-se: *** $p < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

A característica mais marcante da progressão das neoplasias em seus hospedeiros é representada pela invasão e estabelecimento (adesão, migração, proliferação) das células tumorais em seu tecido de origem e em tecidos vizinhos (metástase). Durante este processo ocorrem determinadas mudanças no estroma tecidual hospedeiro, as quais conduzem as células tumorais à invasão e metástase. Segundo DE WEVER e MAREEL (2003), uma notada evidência morfológica desta participação do estroma hospedeiro neste processo é representada pelo aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular (MEC). Além disso, outras mudanças teciduais podem ser observadas, como o aparecimento de células tipo fibroblastos, inflamação, resposta imune e a angiogênese.

Entretanto, as alterações teciduais decorrentes do estabelecimento tumoral podem variar de acordo com seu tecido de origem e os sítios de invasão secundária (metástase). Por exemplo, ZENG, COHEN e GUILLEM (1999), estudando a expressão de colágeno tipo IV em cortes de tecidos humanos comprometidos por câncer colorretal, observaram que a deposição desta proteína era bastante limitada ou ausente em 100% e 23% das amostras de câncer colorretal com metástase e sem metástase, respectivamente. Nestas mesmas amostras, verificaram que a expressão da metaloproteinase MMP-9, que degrada colágeno tipo IV, era notada nas áreas onde a deposição do colágeno IV estava limitada ou ausente, sugerindo que a degradação de proteínas estruturais, como o colágeno IV, pode ser um pré-requisito para o estabelecimento de tumores secundários. Os autores também sugerem que o controle da ativação de collagenases tipo IV pode ser vantajoso para prevenir a progressão de tumores colorretais humanos.

No presente trabalho, o padrão de deposição de proteínas da MEC (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) foi avaliado em amostras de linfonodos normal e comprometido por linfoma histiocítico verdadeiro. Dentro do córtex linfonodal normal, uma variedade de componentes individuais da MEC como colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e tenascina ocorrem em associação com colágenos fibrilares (tipos I, II, III, V e/ou XI). Estas proteínas adquirem um padrão de deposição reticular, formando o estroma cortical com exceção dos folículos

germinativos de linfócitos B. Uma marcação densa e contínua ocorre no endotélio vascular e na cápsula do linfonodo (KALDJIAN *et al.*, 2001).

Marcações seguindo este padrão foram observadas quando avaliamos a deposição de laminina, fibronectina e colágeno tipo IV em linfonodos normais. Entretanto, os resultados obtidos através da avaliação de linfonodos comprometidos por linfoma histiocítico demonstraram um padrão de deposição diferencial para estas proteínas. A marcação para laminina aparece mais restrita à cápsula do linfonodo, apresentando marcações pontuais no córtex. Já a marcação para colágeno tipo IV é reduzida na cápsula do linfonodo, ocorrendo a formação de fibras alongadas e paralelas à cápsula na região cortical. A marcação para fibronectina continua densa na cápsula linfonodal e, na região cortical, ocorre um aumento na deposição desta proteína que forma fibras reticulares circundando as células adjacentes. Segundo JASPARS e colaboradores (1995), os efeitos oriundos destas mudanças na deposição das proteínas da MEC são incertos, entretanto é provável que estejam relacionados com a facilitação do crescimento tumoral e é possível que sejam induzidas pela liberação de citocinas pelas células malignas.

Uma vez que observamos tais modificações ocorridas no estroma cortical do linfonodo comprometido pelo linfoma histiocítico verdadeiro, partimos para a análise, *in vitro*, do potencial destas proteínas da MEC em promover a adesão e a proliferação de uma linhagem celular deste tipo de linfoma. Para esta análise foram utilizados dois métodos de detecção: o método do MTT descrito por MOSMANN (1983) e o método de contagem direta das células. Esta metodologia foi empregada para confirmar os resultados obtidos pelo método do MTT que representa um método indireto para a detecção de células vivas.

Utilizando-se o método estatístico de Pearson, verificamos que os resultados obtidos com relação à adesão celular às proteínas da MEC através dos dois métodos de detecção são correlacionados, onde observamos que as células U-937 apresentaram uma adesão preferencial aos substratos compostos por fibronectina. Para os testes de proliferação das células U-937 sobre as proteínas da MEC não foi possível se estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos através dos dois métodos de detecção. Embora o substrato de

fibronectina tenha proporcionado a maior taxa de proliferação das células U-937 para todos os tempos testados através do método do MTT, isso não foi confirmado através do método de contagem de células, onde observamos taxas de proliferação mais elevadas para os substratos compostos por colágeno tipo IV e laminina. Entretanto, se levarmos em consideração que o método de contagem de células foi utilizado para contar apenas as células presentes no sobrenadante e não aquelas aderidas aos substratos, podemos considerar sim que existe correlação entre os resultados obtidos através dos dois métodos de detecção. Partindo-se desta premissa, sobre o substrato de fibronectina onde constatamos um maior potencial de adesão das células U-937, observamos menor quantidade de células no sobrenadante e, nos substratos de colágeno tipo IV e laminina onde as células U-937 aderem com menor afinidade, verificamos maior quantidade de células no sobrenadante.

Assim, a análise dos resultados de adesão e proliferação celular demonstrou que, dentre as proteínas da MEC estudadas, o substrato composto por fibronectina foi o que promoveu maior resposta das células U-937. Segundo BORNSTEIN e SAGE (2002), várias proteínas da MEC tem sido relacionadas à regulação do ciclo celular e à modulação da adesão celular, entretanto, de acordo com LUKASHEV e WERB (1998), esta regulação via sinalização da MEC pode variar dependendo do tipo celular, dos mecanismos de sinalização e do contexto celular na interação com estas proteínas da MEC.

A fibronectina, embora descoberta há mais de duas décadas, ainda é objeto de vários estudos e tem sido constantemente associada aos processos de adesão e proliferação celular (PANKOV; YAMADA, 2002). Através de seus domínios de ligação, a fibronectina é capaz de interagir com uma variedade de receptores na membrana das células, promovendo a adesão celular e ativando vias de sinalização intracelular. VACCA e colaboradores (2001), demonstraram que a interação entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e a fibronectina promove adesão, proliferação e secreção de metaloproteinases em tumores linfóides humanos através da ativação de cascatas de sinalização intracelular. SEGAT e colaboradores (1994), estudando a habilidade de linhagens celulares de linfoma na adesão a moléculas purificadas da MEC, verificaram uma forte adesão aos substratos compostos por

concentrações variadas de fibronectina, sugerindo que esta proteína pode estar envolvida na disseminação tecidual destas células neoplásicas. Neste mesmo sentido, PUCILLO e colaboradores (1993), observaram que a linhagem U-937 foi capaz de aderir a substratos de fibronectina através da interação com integrinas α_3 e α_5 . Estas células ainda são capazes de interagir com a fibronectina através de proteoglicanos de superfície, regulando assim, de acordo com VOLPI e colaboradores (1994), seu potencial de proliferação e diferenciação.

Tendo em vista os resultados obtidos através da detecção de proteínas da MEC em linfonodos comprometidos e o papel destas nos processos de adesão e proliferação celular, sugerimos que o aumento da deposição tecidual de fibronectina, no caso do linfoma histiocítico verdadeiro, pode estar relacionado com o estabelecimento e a progressão desta neoplasia no tecido hospedeiro.

Muitas proteínas da MEC conseguem afetar os processos de proliferação e adesão celular, entretanto, é bastante provável que a regulação do ciclo celular e a modulação da adesão celular sejam respostas relacionadas à interação entre proteínas específicas da MEC e receptores de membrana plasmática, como integrinas e proteoglicanos (BORNSTEIN; SAGE, 2002). Partindo-se deste pressuposto, decidimos analisar a possível participação de proteoglicanos na adesão e proliferação das células U-937 às proteínas da MEC.

Através da utilização de drogas capazes de modificar a estrutura dos proteoglicanos presentes na membrana plasmática das células U-937, avaliamos as possíveis mudanças ocorridas nos processos de adesão e proliferação destas células sobre substratos compostos por fibronectina. O clorato de sódio, um conhecido inibidor da sulfatação das cadeias de glicosaminoglicanos ligadas aos proteoglicanos de superfície celular, foi capaz de reduzir em 20% a proliferação das células U-937 sobre o substrato de fibronectina, não afetando significativamente a adesão destas células. Resultados semelhantes foram verificados nos trabalhos de ALVAREZ-SILVA e TRENTIN (1996), onde a subsulfatação dos glicosaminoglicanos, promovida pelo tratamento com clorato de sódio, reduziu a proliferação de células leucêmicas WeHi-3B. MENDES DE AGUIAR e colaboradores (2002), novamente com o uso do clorato de sódio,

verificaram uma inibição da proliferação de células de glioma C6 a proteínas da matriz extracelular.

O tratamento com β -xilósídeo, um potente inibidor da ligação das cadeias de glicosaminoglicanos ao corpo protéico dos proteoglicanos, promoveu uma redução ainda maior da proliferação das células U-937 sobre o substrato de fibronectina (cerca de 40%) e, da mesma maneira que o tratamento com clorato de sódio, não afetou significativamente a adesão destas células. Esta alteração na síntese dos proteoglicanos pode promover uma elevada expressão de cadeias de glicosaminoglicanos livres, o que poderia inibir interações com fatores fundamentais para a regulação da proliferação celular (KOLSET *et al.*, 1990). Neste sentido, MOREIRA e colaboradores (2004) demonstraram que a utilização de xilosídeos foi capaz de inibir a proliferação de células endoteliais estimuladas pela adição de soro bovino fetal. Estes autores verificaram que os xilosídeos promovem uma elevada síntese de glicosaminoglicanos nestas células e sugerem que estas moléculas estejam prendendo fatores de crescimento presentes no soro bovino fetal, uma vez que os glicosaminoglicanos apresentam alta afinidade a fatores de crescimento, inibindo assim a síntese de DNA e a proliferação destas células. Ainda podemos sugerir que a própria síntese de proteoglicanos desprovidos de suas cadeias laterais de glicosaminoglicanos impossibilite às células de obter sinais provindos do microambiente extracelular. Muitos proteoglicanos já foram descritos como potentes receptores de sinais via interação célula-célula, célula-MEC e com fatores solúveis, os quais desencadeiam cascatas intracelulares que modulam a atividade celular. HIRABAYASHI e colaboradores (1998), demonstraram que a superexpressão do proteoglicano sindecan-1 promove uma maior taxa de proliferação e o desenvolvimento de metástases em células de carcinoma murino. O proteoglicano sindecan-4 também tem sido relacionado à ligação com os domínios funcionais da fibronectina, levando à ativação da cascata de sinalização intracelular da proteína cinase C e a adesão focal de fibroblastos sobre substratos de fibronectina (WOODS *et al.*, 2000). Outros proteoglicanos relacionados a processos de migração e proliferação celular são os glipicans, que tem sido bastante associados com a interação a vários fatores de crescimento (KRESSE; SCHONHERR, 2001).

Como já comentado anteriormente, a fibronectina, através de seus domínios de ligação para variadas moléculas da MEC, incluindo proteoglicanos, tem sido relacionada aos processos de adesão e proliferação de alguns tipos celulares (PANKOV; YAMADA, 2002). Através dos resultados obtidos no presente trabalho, sugerimos que a fibronectina é capaz de desencadear sinais intracelulares através da interação com proteoglicanos presentes na superfície das células U-937, pois alterações estruturais destes proteoglicanos levam a redução da taxa de proliferação destas células. Entretanto, a adesão das células U-937 ao substrato de fibronectina parece não estar relacionada à interação com proteoglicanos de superfície celular. Podemos sugerir que, neste caso, outras moléculas sejam as principais responsáveis pela adesão das células U-937 à fibronectina, como as integrinas, uma vez que a fibronectina apresenta vários domínios de ligação para estas moléculas. Inclusive, já foi demonstrado que a linhagem U-937 é capaz de aderir a substratos de fibronectina através da interação com integrinas α_3 e α_5 (PUCILLO *et al.*, 1993).

Em síntese, os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que alterações promovidas no estroma tecidual durante os processos neoplásicos podem afetar diretamente as características ou o potencial de progressão das células tumorais. De acordo com DE WEVER e MAREEL (2003), esta dinâmica entre tumor e hospedeiro pode ser bem entendida em termos de ecossistemas onde há uma contínua interação entre as células participantes e os elementos extracelulares. Uma característica dos ecossistemas é que uma pequena mudança em um de seus componentes pode causar uma dramática reorganização de todo o sistema.

7 CONCLUSÕES

As avaliações da deposição tecidual das proteínas da MEC laminina, fibronectina e colágeno tipo IV demonstraram que estas se apresentam na cápsula e no estroma cortical do linfonodo normal. O linfonodo comprometido, em um caso de linfoma histiocítico verdadeiro, apresenta deposição aumentada da proteína fibronectina, principalmente no córtex deste órgão, enquanto que as proteínas laminina e colágeno tipo IV, embora ainda presentes, parecem estar mais restritas à cápsula linfonodal;

A fibronectina depositada em grande quantidade no córtex linfonodal comprometido demonstrou ser um ótimo substrato para a adesão e a proliferação de células U-937 que representam uma linhagem de linfoma histiocítico verdadeiro;

As células U-937 apresentaram uma taxa de adesão e proliferação bastante reduzida sobre os substratos compostos por laminina e colágeno tipo IV em comparação aos substratos de fibronectina;

O método do MTT utilizado para quantificar as taxas de adesão e proliferação das células U-937 sobre as proteínas da MEC apresentou resultados correlacionados aqueles obtidos através da contagem de células, demonstrando ser uma metodologia confiável e prática para este tipo de experimentação;

O uso do clorato de sódio ou do β -xilósídeo reduziram a proliferação das células U-937 sobre o substrato composto por fibronectina evidenciando a participação de proteoglicanos na regulação do ciclo celular neste modelo experimental;

A adesão das células U-937 sobre o substrato de fibronectina não foi afetada pela utilização do clorato de sódio ou do β -xilósídeo, sugerindo que, neste modelo, a adesão das células não esteja diretamente relacionada aos proteoglicanos de superfície celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 2064p.

ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. Undersulfation of glycosaminoglycans reduces the proliferation of a leukemia cell line in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1239-1242. 1996.

ARMSTRONG, P. B.; ARMSTRONG, M. T. Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1470, p. O9-O20. 2000.

AUMAILLEY, M.; GAYRAUD, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. **Journal of Molecular Medicine**, v. 76, p. 253-265. 1998.

AUMAILLEY, M.; SMYTH, N. The role of laminins in basement membrane function. **Journal of Anatomy**, v. 193, p. 1-21. 1998.

BEN-ZE'EV, A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. **Current Opinion on Cell Biology**, v. 9, p. 99-108. 1997.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167-223. 2001.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 608-616. 2002.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **Journal of pathology**, v. 200, p. 423-428. 2003.

BOUABDALLAH, R.; ABÉNA, P.; CHETAÏLLE, B.; AURRAN-SCHLEINITZ, T.; SAINTY, D.; DUBUS, P.; ARNOULET, C.; COSO, D.; XERRI, L.; GASTAUT, J. A. True histiocytic lymphoma following B-acute lymphoblastic leukaemia: case report with evidence for a common clonal origin in both neoplasms. **British Journal of Haematology**, v. 113, p. 1047-1050. 2001.

BRUNNER, G.; REIMBOLD, K.; MEISSAUER, A.; SCHIRRMACHER, V.; ERKELL, L. J. Sulfated glycosaminoglycans enhance tumor cell invasion in vitro by stimulating plasminogen activation. **Experimental Cell Research**, v. 239, p. 301-310. 1998.

CHAN, B. M.; MATSUURA, N.; TAKADA, Y.; ZETTER, B. R.; HEMLER, M. E. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. **Science**, v. 251, n. 5001, p. 1600-1602. 1991.

CHENG, Y-S.; CHAMPLIAUD, M-F.; BURGESSON, R. E.; MARINKOVICH, M. P.; YURCHENCO, P. D. Self-assembly of laminina isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 31525-31532. 1997.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Developmental Dynamics**, v. 218, p. 213-234. 2000.

CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Modifications in the synthesis of membrane-associated chondroitin sulfate proteoglycans in hematopoietic progenitor cells are accompanied by alterations in their adhesive properties. **Journal of Cell Physiology**, v. 159, p. 142-150. 1994.

CUSINATO, F.; CARRARA, M.; BOVA, S.; BRUNI, A. Cholesterylphosphoserine as inhibitor of cell adhesion and actin polymerization in human T cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1451, p. 35-47. 1999.

DE ARCANGELIS, A.; LEFEBVRE, O.; MECHINE-NEUVILLE, A.; ARNOLD, C.; KLEIN, A.; REMY, L.; KEDINGER, M.; SIMON-ASSMANN, P. Overexpression of laminin alpha1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 1, p. 44-53. 2001.

DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 429-447. 2003.

ELGHETANY, M. T. True histiocytic lymphoma: is it an entity? **Leukemia**, v. 11, p. 762-764. 1997.

ENGBRING, J. A.; KLEINMAN, H. K. The basement membrane matrix in malignancy. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 465-470. 2003.

EYDEN, B. Perivascular amorphous matrices containing laminin and typeIV collagen not organised as a conventional basal lamina: identification by electron microscopy and implications for the control of cell biological processes. **Ultrastructural Pathology**, v. 23, p. 355-357. 1999.

FOLKMAN, J.; HAHNFELDT, P.; HLATKY, L. Cancer: looking outside the genome. **Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 76-79. 2000.

FRANKE, F. E.; VON GEORGI, R.; ZYGMUNT, M.; MUNSTEDT, K. Association between fibronectin expression and prognosis in ovarian carcinoma. **Anticancer Research**, v. 23, n. 5b, p. 4261-4267. 2003.

FREIRE, E.; COELHO-SAMPAIO, T. Self-assembly of laminin induced by acidic pH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 817-822. 2000.

FRENCH-CONSTANT, C. Alternative splicing of fibronectin-many different proteins but few different functions. **Experimental Cell Research**, v. 221, p. 261-271. 1995.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell**, v. 60, n. 5, p. 849-859. 1990.

GORDON, P. B.; ZANGER, D. R.; HATCHER, V. B. Extracellular matrix proteoglycans and cell-substratum adhesion of human endothelial cells: the effect of methyl & D-xylopyranoside. **Carbohydrate Research**, v. 151, p. 121-134. 1986.

HAN, S.; SIDELL, N.; ROSER-PAGE, S.; ROMAN, J. Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. **International Journal of Cancer**, v. 111, n. 3, p. 322-331. 2004.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H. K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T. A.; BLOOMFIELD, C. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, p. 3835-3849. 1999.

HIRABAYASHI, K.; NUMA, F.; SUMINAMI, Y.; MURAKAMI, A.; MURAKAMI, T.; KATO, H. Altered proliferative and metastatic potential associated with increased expression of syndecan-1. **Tumor Biology**, v. 19, p. 454-463. 1998.

HULMES, D. J. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. **Journal of Structural Biology**, v. 137, p. 2–10. 2002.

IOZZO, R. V.; COHEN, I. Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. **Experientia**, v. 49, p. 447-455. 1993.

JASPARS, L. H.; BLOEMENA, E.; BONNET, P.; VAN DER VALK, P.; MEIJER, C. J. L. M. Distribution of extracellular matrix components and their receptor in human lymphoid tissue and B-cell non-Hodgkin lymphomas. **Histopathology**, v.26, p. 113-121. 1995.

JOHNSEN, M.; LUND, L. R.; ROMER, J.; ALMHOLT, K.; DANO, K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 667-671. 1998.

KALDJIAN, E. P.; GRETZ, E.; ANDERSON, A. O.; SHI, Y.; SHAW, S. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. **International Immunology**, v. 13, n. 10, p. 1243-1253. 2001.

KOLSET, S. O.; SAKURAI, K.; IVHED, I.; OVERVATN, A.; SUZUKI, S. The effect of β -D-xylosides on the proliferation and proteoglycan biosynthesis of monoblastic U-937 cells. **The Biochemical Journal**, v. 265, p. 637-645. 1990.

KRESSE, H.; SCHONHERR, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **Journal of Cell Physiology**, v. 189, p. 266-274. 2001.

LAKKA, S. S.; JASTI, S. L.; GONDI, C.; BOYD, D.; CHANDRASEKAR, N.; DINH, D. H.; OLIVERO, W. C.; GUJRATI, M.; RAO, J. S. Downregulation of MMP-9 in ERK-mutated stable transfectants inhibits glioma invasion in vitro. **Oncogene**, v. 21, n. 36, p. 5601-5608. 2002.

LAUWAET, T.; OLIVEIRA, M. J.; MAREEL, M.; LEROY, A. Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 923-931. 2000.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v. 411, p. 375-379. 2001.

LUKASHEV, M. E.; WERB, Z. ECM signaling: orchestrating cell behavior and misbehavior. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 437-441. 1998.

MENDES DE AGUIAR, C. B. N.; GARCEZ, R. C.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, p. 563-571. 2002.

MOREIRA, C. R.; LOPES, C. C.; CUCCOVIA, I. M.; PORCINATTO, M. A.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Heparan sulfate and control of endothelial cell proliferation: increased synthesis during the S phase of the cell cycle and inhibition of thymidine incorporation induced by ortho-nitrophenyl-beta-d-xylose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1673, n. 3, p. 178-185. 2004.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63. 1983.

NADER, H. B. Characterization of heparan and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 10518-10523. 1991.

PUCILLO, C. E. M.; COLOMBATTI, A.; VITALE, M.; SALZANO, S.; ROSSI, G.; FORMISANO, S. Interactions of promonocytic U-937 cells with proteins of the extracellular matrix. **Immunology**, v. 80, p. 248-252. 1993.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3861-3863. 2002.

PARK, C. C.; BISSELL, M. J.; BARCELLOS-HOFF, M. H. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p. 324-328. 2000.

PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANEN, I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, p. 197-207. 2002.

ROMBERGER, D. J. Fibronectin. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 29, n. 7, p. 939-943. 1997.

RUOSLAHTI, E. Integrin signaling and matrix assembly. **Tumour Biology**, v. 17, n. 2, p. 117-124. 1996.

SCOTT-BURDEN, T. Extracellular matrix: the cellular environment. **International Union of Physiological Science**, v. 9, p. 110-115. 1994.

SEGAT, D.; PUCILLO, C.; MAROTTA, G.; PERRIS, R.; COLOMBATTI, A. Differential attachment of human neoplastic B cells to purified extracellular matrix molecules. **Blood**, v. 83, n. 6, p.1586-1594. 1994.

STONEHOUSE, T. J.; WOODHEAD, V. E.; HERRIDGE, P. S.; ASHRAFIAN, H.; GEORGE, M.; CHAIN, B. M.; KATZ, D. R. Molecular characterization of U-937-dependent T-cell co-stimulation. **Immunology**, v. 96, p. 35-47. 1999.

SUNDSTROM, C.; NILSSON, K. Establishment and characterization of human histiocytic lymphoma cell line (U-937). **International Journal of Cancer**, v. 17, p. 565-577. 1976.

SCHWARZBAUER, J. E.; SECHLER, J. L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 622-627. 1999.

TIMPL, R.; RHODES, H.; ROBEY, P.; RENNARD, S.; FOIDART, J. M.; MARTIN, G. R. Laminin – a glycoprotein from basement membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 9933-9937. 1979.

TRAVERS, H.; FRENCH, N. S.; NORTON, J. D. Suppression of tumorigenicity in Ras-transformed fibroblasts by alpha 2(I) collagen. **Cell Growth and Differentiation**, v. 7, n. 10, p. 1353-1360. 1996.

UMANSKY, V.; SCHIRRMACHER, A.; ROCHA, M. New insights into tumor-host interactions in lymphoma metastasis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 74, p. 353-363. 1996.

VACCA, A.; RIA, R.; PRESTA, M.; RIBATTI, D.; IURLARO, M.; MERCHIONNE, F.; TANGHETTI, E.; DAMMACCO, F. $\alpha_v\beta_3$ integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 993-1003. 2001.

VOLPI, N.; PETRINI, M.; CONTE, A.; VALENTINI, P.; VENTURELLI, T.; BOLOGNANI, L.; RONCA, G. Effects of glycosaminoglycans on U-937 leukemia cell proliferation and differentiation: structure-function relationship. **Experimental Cell Research**, v. 215, p. 119-130. 1994.

WEAVER, V. M.; PETERSEN, O. W.; WANG, F.; LARABELL, C. A.; BRIAND, P.; DAMSKY, C.; BISSELL, M. J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. **Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 1, p. 231-245. 1997.

WEITZMAN, J. B.; HEMLER, M. E.; BRODT, P. Reduction of tumorigenicity by alpha 3 integrin in a rhabdomyosarcoma cell line. **Cell Adhesion and Communication**, v. 4, n. 1, p. 41-52. 1996.

WOODS, A.; LONGLEY, R. L.; TUMOVA, S.; COUCHMAN, J. R. Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 374, n. 1, p. 66-72. 2000.

YAMADA, K. M.; OLDEN, K. Fibronectins--adhesive glycoproteins of cell surface and blood. **Nature**, v. 275, n. 5677, p. 179-184. 1978.

ZENG, Z.S.; COHEN, A. M.; GUILLEM, J. G. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 5, p. 749-755. 1999.

ZHANG, Z.; VOURI, K.; RUOSLAHTI, E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 6161-6165. 1995.