PEPTÍDEO C16 DERIVADO DA LAMININA REGULA MIGRAÇÃO, INVASÃO E SECREÇÃO DE PROTEASE EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO HUMANO ATRAVÉS DE INTEGRINAS E DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO AKT E ERK

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

São Paulo 2008

PEPTÍDEO C16 DERIVADO DA LAMININA REGULA MIGRAÇÃO, INVASÃO E SECREÇÃO DE PROTEASE EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO HUMANO ATRAVÉS DE INTEGRINAS E DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO AKT E ERK

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger

São Paulo 2008 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

de Souza, Leticia Nogueira da Gama.

Peptideo C16 derivado da laminina regula migração, invasão e secreção de protease em linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico humano através de integrinas e das vias de sinalização AKT e ERK / Leticia Nogueira da Gama de Souza. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Ruy Gastaldoni Jaeger.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia das Neoplasias Bucais.

Versão do título para o inglês: Laminin peptide C16 regulates migration, invasion and protease activity of adenoid cystic carcinoma cells through integrins, AKT and ERK.

Descritores: 1. Neoplasia das glândulas salivares 2. Carcinoma adenóide cístico 3. Matriz extracelular 4. Laminina 5. Integrinas 6. Metaloproteinase da matriz 1. Jaeger, Ruy Gastaldoni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB203/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Leticia Nogueira da Gama de Souza.		
T <mark>ítulo da Tese:</mark>	Peptídeo C16 derivado da laminina regula migração, invasão e secreção de protease em linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico humano através de integrinas e das vias de sinalização AKT e ERK.		
Orientador(a):	Ruy Gastaldoni Jaeger.		

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438 e-mail: ccp@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 263/08, referente ao projeto intitulado: "Papel de peptídeos bioativos da laminina na migração e invasão de linhagens celulares derivadas de neoplasias de glândulas salivares" sob a responsabilidade de Letícia Nogueira da Gama de Souza, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 26 de agosto de 2008.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO Coordenador da CEPsh - ICB/USP Dedico esse trabalho à minha família e em especial aos meus pais. Para minha mãe Heloisa e meu pai Geraldo Elizo, os principais responsáveis por essa conquista. Sem o apoio de vocês e a confiança em mim depositada a jornada teria sido mais difícil, pois mesmo estando distantes sempre se mostraram muito presentes. Obrigada por me ensinarem que estudo e conhecimento são fundamentais na vida de uma pessoa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Ruy Gastaldoni Jaeger, que ao me receber em seu laboratório permitiu que um sonho pudesse se concretizar. Aprendi com o senhor a fazer ciência de qualidade e tive a oportunidade de adquirir grandes conhecimentos na área, que serão fundamentais para todas as etapas que seguirei daqui para frente. Obrigada pela orientação e pelo incentivo durante a realização desse projeto.

Aos meus irmãos, Sérgio, Cristina e Rodrigo que me deram apoio e incentivo para a realização desse projeto. Ao Rodrigo devo agradecer a companhia, amizade e solidariedade oferecidas durante o tempo em que moramos juntos em São Paulo. Ter você por perto me ajudou a concretizar esse sonho. Agradeço ainda a todos os meus tios e primos pelo carinho e atenção.

Ao Willian pelo carinho, amizade e suporte desde o período da faculdade. Você me fez acreditar que daria certo e esteve presente nos momentos de alegria, mas principalmente nos momentos difícieis. Grande parte dessa conquista se deve ao seu apoio. Obrigada por tudo! À Dra. Vanessa Morais Freitas, que se revelou com o tempo muito mais do que uma co-orientadora, mas uma grande amiga. Obrigada pela paciência, pelo carinho e treinamento. Agradeço ainda a colaboração nesse projeto, com a realização dos experimentos de imunohistoquímica de laminina e imunofluorescência de colágeno. Para mim, você é exemplo de pessoa batalhadora e uma pesquisadora excepcional.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro. A bolsa concedida foi importante para o projeto e proporcionou a realização de um trabalho com melhor qualidade durante o Curso de Pós-Graduação.

A concretização desse projeto também foi possível devido ao apoio recebido por outros professores e pesquisadores do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Essa ajuda ocorreu de diferentes maneiras, mas todas foram fundamentais para que o trabalho pudesse ser conduzido da melhor forma.

À Profa. Dra. Telma M. T. Zorn e toda sua equipe, sempre muito atenciosos e carinhosos com todos. Agradeço o espaço cedido em seu Laboratório para a realização de experimentos na Cultura Celular. A senhora é referência para quem deseja fazer pesquisa de qualidade. Obrigada também pela oportunidade de participar do curso ministrado para a Pós-Graduação, foi muito importante para minha formação.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli e sua equipe pelo apoio, atenção e equipamentos cedidos durante a realização desse trabalho. Sempre fui recebida com alegria em seu Laboratório. Obrigada!

À Profa. Dra. Marinilce F. Santos, Profa. Dra. Maria Luiza M. B. de Chaves e Proaf. Dra. Marisa Ionta, obrigada pelas sugestões valiosas feitas durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Anselmo S. Moriscot e seus alunos pelas permissões para a utilização da sala de uso comum e pela atenção e carinho. Gostaria de

agradecer à sua aluna de Mestrado Vanessa Vilas-Boas pela realização dos experimentos de "Real time PCR", que foram importantes para outro projeto.

À Profa. Dra. Irene Yan, nossa vizinha de Laboratório. Agradeço por permitir a utilização de seus equipamentos, pela disponibilidade e atenção.

À Profa. Dra. Patrícia Gama pela orientação nos cursos de Difusão Cultural. Todas as sugestões e idéias foram importantes para minha formação dentro do Curso de Pós-Graduação. Agradeço também aos seus alunos pela atenção e disponibilidade.

Ao Dr. Matthew Philip Hoffman do National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health. O pesquisador é colaborador fundamental em vários projetos desenvolvidos no Laboratório. Essa colaboração tem ocorrido por de troca de idéias e envio de reagentes.

Aos meus professores da Universidade Federal do Espírito Santo, em especial ao Prof. Dr. Rogério Azeredo e à Profa. Dra. Liliana Aparecida Pimenta, grandes amigos e incentivadores desde a graduação. Muito obrigada!

A todos os amigos e colegas de Pós-Graduação. Agradeço aqueles que já passaram pelo nosso Laboratório e aqueles que ainda estão presentes. Adriane, Camila, Elaine, Karen, Luciana, Milza, Emerson, João, Renato, Normando, Moacir e Raphael, obrigada pelo carinho. Camila, Adriane, Elaine e Milza participar de trabalhos com vocês foi um grande apredizado, porém mais importante foi a amizade que nasceu desses projetos! Adriane, obrigada também pelo apoio nas etapas finais da tese.

Edson e Marley, obrigada pelo suporte técnico e pela ajuda em vários momentos. Sempre receptivos e dispostos a ajudar vocês contribuíram para o andamento e realização desse trabalho.

Aos membros da Comissão de Pós-Graduação Profa. Dra. Dânia Hamassaki-Brito, Profa. Dra. Marinilce F. Santos, Profa. Dra. Marília C. L. Seelaender e Profa. Dra. Edna T. Kimura e aos funcionários da secretaria, pela dedicação e busca pela melhoria e crescimento do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.

RESUMO

GAMA-DE-SOUZA, L. N. Peptídeo C16 derivado da laminina regula migração, invasão e secreção de protease em linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico humano através de integrinas e das vias de sinalização AKT e ERK. 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Avaliamos a capacidade de indução de migração, invasão e secreção de protease pelo peptídeo derivado da laminina C16 (KAFDITYVRLKF, cadeia γ 1) em linhagem celular (CAC2) de carcinoma adenóide cístico humano. Laminina γ 1 foi imunolocalizada no carcinoma adenóide *in vivo* e *in vitro*. Ensaio de "ferida", em câmara bipartite e por vídeo microscopia ("time-lapse") mostraram que C16 estimula migração em células CAC2. C16 também estimulou invasão em ensaio com câmaras bipartites cobertas com Matrigel. Invasão depende de atividade de protease. Zimografia mostrou que C16 aumentou secreção de MMPs 2 e 9. Diferentes vias de sinalização podem estar relacionadas com os efeitos de C16. "Immunoblot" revelou que C16 aumentou a fosforilação de AKT e ERK. Para o estudo de possíveis receptores do peptídeo, preparações de membrana foram passadas em colunas de afinidade com C16 acoplado. Uma banda de 40kDa foi eluída e analisada por espectrometria de massa (LC-MS/MS) que identificou a cadeia α 1 do colágeno. O fragmento de colágeno eluído poderia ser parte de um complexo protéico envolvendo C16. Integrinas são receptores de colágeno e candidatas a fazerem parte desse complexo. Células CAC2 expressaram as integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ and $\beta 1$. Silenciamento dessas integrinas por RNAi promoveu redução da migração e secreção de protease induzidas por C16. Sugerimos que C16 estimularia migração, invasão e secreção de protease em células de carcinoma adenóide cístico através de integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$. O sinal gerado por C16 seria transduzido pelas vias AKT e ERK.

Palavras-Chave: Neoplasias das Glândulas Salivares. Carcinoma Adenóide Cístico. Matriz Extracelular. Laminina. Integrinas. Metaloproteinases da Matriz.

ABSTRACT

GAMA-DE-SOUZA, L. N. Laminin peptide C16 regulates migration, invasion and protease activity of adenoid cystic carcinoma cells through integrins, AKT and ERK. 2008. 123 f. Ph. D. Thesis (Tecidual and Cellular Biology) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

We studied induction of migration, invasion and protease activity by lamininderived peptide C16 (KAFDITYVRLKF, v1 chain) in a cell line (CAC2) from adenoid cystic carcinoma. Laminin γ 1 was immunolocalized in adenoid cystic carcinoma in vivo and in vitro. C16 increased migratory activity of CAC2 cells, as shown by monolayer wound assay, Transwell migration assay and timelapse video microscopy. This peptide also stimulated cell invasion in Transwell chambers coated with Matrigel. Invasion depends on protease activity. Zymograms showed that C16 increased secretion of MMPs 2 and 9. Different signaling pathways could be related to C16 regulation in CAC2 cells. Immunoblot showed that C16 increased phosphorylation of both AKT and ERK compared to controls. To study putative receptors of this peptide we used affinity chromatography. Membrane preparations were run through C16-affinity columns. A 40kDa band was eluted and analyzed by mass spectrometry (LC-MS/MS) identifying a collagen α 1 chain. The collagen fragment eluted could be part of a protein complex involving C16. This protein complex may include integrins, which are collagen receptors. CAC2 cells exhibited αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ and $\beta 1$ integrins. siRNA knockdown of these integrins inhibited both C16-induced migration and protease activity. We propose that C16 increases migration, invasion and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through α 5 β 1 and α v β 3 integrins. The signal generated by C16 is transduced by AKT and ERK signaling pathways.

Keywords: Salivary Gland Neoplasia. Adenoid Cystic Carcinoma. Extracellular Matrix. Laminin. Integrins. Matrix Metalloproteinases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1-	Imunohistoquímica e imunofluorescência cadeia γ1 da
	laminina-11184
Figura 5.2 -	Ensaio de "ferida". C16 induz atividade de migração em
	células CAC286
Figura 5.3 -	Ensaio em câmara bipartite (A) e "time-lapse" (B)89
Figura 5.4 -	Ensaio de invasão (A) e zimografia (B)90
Figura 5.5 -	"Immunoblot" do ensaio de "ferida" e zimografia (A). Zimografia
	e "immunoblot" células CAC2 tratadas com UO126
	(B)92
Figura 5.6 -	Espectrometria de massa (A). Imunofluorescência e
	"immunoblot" de colágeno I (B)94
Figura 5.7 -	Imunofluorescência de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ (A).
	Cromatografia de C16 e "immunoblot" para integrinas
	(B)96
Figura 5.8 -	Ensaio de migração (A), zimografia (B) e "immunoblot" (C) de
	células CAC2 tratadas com RNAi para
	integrinas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AG73 seqüência dos aminoácidos RKRLQVQLSIRT (arginina-lisinaarginina-leucina-glicina-valina-glicina-leucina-serina-isoleucinaarginina-treonina), com função biológica importante
- BSA do inglês "Bovine Serum Albumine" traduzido como albumina sérica bovina
- °C graus Celsius
- Ca²⁺ íon cálcio
- C16 sequência dos aminoácidos KAFDITYVRLKF (lisina-asparaginafenilalanina-ác.aspártico-isoleucina-treonina-tirosina-valina-argininaleucina-lisina- fenilalanina)
- YIGSR seqüência dos aminioácidos (tirosina-isoleucina-glicina-serinaarginina) com função biológica importante
- cm² centímetros quadrados
- CO₂ gás carbônico
- D dalton
- DMEM do inglês "Dulbecco's Modified Eagles' Medium" traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO di-metil sulfóxido
- EDTA do inglês "ethylenediamine-tetra acetic acid" traduzido como ácido etilenodiamino tetra acético
- EGF seqüência dos aminioácidos ácido glutâmico-glicina-fenilalanina (Glu-Gly-Phe), com função biológica importante

- ERK do inglês "extracellular response kinase", traduzido como quinase de resposta extracelular
- Fig. Figura
- g gravidade
- hs horas
- HSG do inglês "human submandibular gland", traduzido como glândula submandibular humana
- kDa kilodalton
- LC-MS/MS do inglês "Liquid chromatography-mass spectrometry", traduzido como cromatografia líquida espectrometria de massa
- MAPK do inglês "Mitogen-Activated Protein Kinase", traduzido como mitógeno-ativada proteína quinase
- M molar
- mM milimolar
- Mg²⁺ íon magnésio
- mg miligramas
- mg/ml miligramas por mililitros
- min. minutos
- ml mililitro
- mm milímetro
- mM milimolar
- MMPs do inglês "matrix metalloproteinases" traduzido como metaloproteinases da matriz

- Na₃VO₄ ortovanadato de sódio
- NIDCR do inglês "National Institute of Dental and Craniofacial Research
- NIH do inglês "National Institutes of Health
- nm nanometro
- OMS Organização Mundial de Saúde
- PBS do inglês "phosphate-buffered saline", traduzido como tampão fosfato-salina
- pH cologarítmo da concentração hidrogeniônica de uma solução (potencial hidrogeniônico)
- PMSF do inglês "phenylmethylsulfonyl fluoride"
- RGD seqüência dos aminioácidos arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), com função biológica importante
- SDS Pagedo inglês "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" eletroforese de gel de poliacrilamida, tendo como agente denaturante sulfato dodecil sódico

LISTA DE SÍMBOLOS

- α alfa
- β beta
- γ gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO23				
2	REVISÃO DE LITERATURA 26				
2.1	Matriz extracelular e membrana basal				
2.2	Laminina-111 e peptídeo derivado C16				
2.3	Carcinoma adenóide cístico43				
2.4	Metaloprotease de Matriz 47				
2.5	Integrinas53				
3	PROPOSIÇÃO60				
4	MATERIAL E MÉTODOS 61				
4.1	Peptídeo utilizado 61				
4.2	Detecção da cadeia γ1 da laminina <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em carcinoma				
ade	nóide cístico 61				
4.2. 4.2. 4.2. 4.3	 Imunohistoquímica				
inva	asão e secreção de proteases nas células CAC263				
4.3. 4.3. 4.3. 4.3. 4 .3.	 Ensaio de "ferida" em monocamada				
mig	ratória e/ou invasiva induzida pelo peptídeo C16 nas células CAC2 68				
4.5	Papel de ERK na sinalização de C16 nas células CAC2 69				
4.6	Isolamento e purificação de receptores das células CAC2 a partir				
de colunas de afinidade contendo o peptídeo imobilizado					
4.6. 4.6. 4.6. 4.7	 Escolha e preparo das colunas de afinidade				
4.7. imul 4.7. mer 4.7.	1Análise da expressão das integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$ através denofluorescência722"Immunoblot" para integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$ em preparações dembranas de células CAC2733RNA de interferência				

4.7.	4 "Immunoblot"	74
4.7.	5 Ensaio de migração (células tratadas com RNAi)	75
4.7.0 nas	6 Integrinas regulando a atividade de protease induzida por C16 células CAC2	75
4.8	Análise estatística	76
5	RESULTADOS	77
5.1	Presença da cadeia γ1 da laminina <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	77
5.2	O peptídeo C16 regula atividade de migração na célula CAC2	77
5.3	O peptídeo C16 regula atividade de invasão e de secreção	de
MM	Ps em células CAC2	78
5.4	As vias de sinalização AKT e ERK estão "downstream" a C16	na
regu	ulação de migração e secreção de MMPs nas células CAC2	79
5.5	UO126 inibe a produção de MMPs induzidas por C16	79
5.6	Cromatografia de afinidade e espectrometria de massa sugere	эm
que	integrinas e colágeno I formam um complexo com C16 em célul	as
CAC	C2	80
5.7	Integrinas sinalizam "downstream" de C16 e regulam migração) e
sec	reção de MMPs em células CAC2	81
6	DISCUSSÃO	99
7	CONCLUSÕES1	80
REF	FERÊNCIAS1	09
ANE	EXO1	25

1 INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC), composta por uma grande variedade de moléculas estruturais, como colágenos, glicoproteínas não-colágenas e proteoglicanos, é uma estrutura ativa e funciona como um reservatório biológico para uma variedade de componentes. Esses, por sua vez, desempenham papel complexo na regulação do comportamento das células com as quais fazem contato, influenciando seu desenvolvimento, crescimento, sobrevivência, migração, transdução de sinais, forma e função (ALBERTS et al., 2004; AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998; BORG, 2004; BORNSTEIN e SAGE, 2002; COMOGLIO e TRUSOLINO, 2005; KLEINMAN et al., 2003; MINER e YURCHENCO, 2004; MOTT e WERB, 2004; PIEZ, 1997; PUPA et al., 2002; SCHENK e QUARANTA, 2003; VU, 2001; YURCHENCO e O'REAR, 1994).

A membrana basal é uma especialização da MEC. Essa importante estrutura é uma fina rede tridimensional de macromoléculas incluindo, colágeno, laminina, entactina, nidogênio, e proteoglicano heparan sulfato, que representa não somente um sólido suporte para as células, mas também atua como fonte de citocinas e fatores de crescimento (AUMAILLEY et al., 2005; EKBLOM, 1996; KLEINMAN et al., 2003).

Diversas linhas de pesquisa mostraram que componentes da matriz extracelular e da membrana basal contêm domínios crípticos, que são expostos através de proteólise e estimulam respostas biológicas diferentes daquelas estimuladas pelas moléculas intactas (FAISAL KHAN et al., 2002; MOTT e WERB, 2004; SCHENK e QUARANTA, 2003). Esses domínios expostos por proteólise são chamados de matricriptinas, matricinas, ou sítios crípticos (FAISAL KHAN et al., 2002; MOTT e WERB, 2004; SCHENK e QUARANTA, 2003). Os sítios crípticos são representados por fragmentos e peptídeos bioativos, os quais estão possivelmente presentes na maioria das moléculas da matriz extracelular (DAVIS et al., 2000; MOTT e WERB, 2004; SCHENK e QUARANTA, 2003). Dentre as proteínas da MEC, a laminina possui múltiplos sítios crípticos relacionados com diferentes atividades biológicas, incluindo adesão, migração, diferenciação, angiogênese e secreção de protease (FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; GRANT et al., 1992; HOFFMAN et al., 1998; MALINDA e KLEINMAN, 1996; NOMIZU et al., 1998). Tem sido sugerido que a MEC desempenha importante papel como fator regulador das diferenças fenotípicas nas neoplasias de glândula salivar (CAPUANO e JAEGER, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2001; FRANCA et al., 2000; FRANCA et al., 2001; FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; JAEGER, M. M. et al., 1997).

Nosso laboratório já demonstrou que a laminina 111 (antiga laminina 1, Aumailley *et al.*, 2005) regula o fenótipo de linhagens celulares derivadas de carcinoma adenóide cístico (células CAC2) e de miopitelioma (células M1) (CAPUANO e JAEGER, 2004; FRANCA et al., 2000; FRANCA et al., 2001; FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; JAEGER et al., 2008; MORAIS FREITAS et al., 2007). Tanto o carcinoma adenóide cístico quanto o mioepitelioma expressam proeminente matriz extracelular (CHENG et al., 1995; CHENG et al., 1992). Adicionalmente, esses dois tumores dividem a mesma origem: células do ducto intercalado da glândula salivar (BATSAKIS, 1980).

O carcinoma adenóide cístico é freqüente neoplasia maligna de glândula salivar com recorrência e metástase mesmo após tratamento (SEIFERT e SOBIN, 1992). Exibe diferentes subtipos histológicos, podendo ser sólido, tubular ou pseudocístico (DARDICK, 1996; SEIFERT e SOBIN, 1992). Característica importante do carcinoma adenóide cístico é a sua afinidade por tecidos ricos em membrana basal, o que facilita a disseminação peri-vascular ou peri-neural (SEIFERT e SOBIN, 1992).

Crescimento de células CAC2 dentro de gel de laminina 111 criou estruturas semelhantes a ductos e pseudocistos, recapitulando o fenótipo da neoplasia *in vivo* (FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004). Além de estudarmos os efeitos da molécula íntegra de laminina 111, temos atualmente analisado os efeitos de domínios particulares dessa molécula em células CAC2 e M1. Esses estudos começaram com os peptídeos SIKVAV (FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007) e AG73 (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008), derivados da cadeia α 1 da laminina 111. O primeiro foi capaz de regular a morfologia e também estimular secreção de protease em

células CAC2 (FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007). Já o peptídeo AG73 está relacionado com regulação da morfologia, adesão e secreção de MMP em células CAC2 e M1 (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

Outro interessante peptídeo bioativo derivado da laminina 111 é C16 (KAFDITYVRLKF), localizado no braço curto da cadeia γ 1, no primeiro domínio globular (KURATOMI et al., 2002; NOMIZU et al., 1997). A cadeia γ 1 está presente na maioria das isoformas de laminina, exceto a 332 (antiga laminina 5). O peptídeo C16 está presente em pelo menos 11 de 13 lamininas (BURGESON et al., 1994; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; NOMIZU et al., 1997; PONCE et al., 2003). Esse peptídeo influencia formação de estruturas semelhantes a capilares, está envolvido com adesão, promove crescimento de neuritos e diminui formação de ácinos em células crescidas no Matrigel (NOMIZU et al., 1997). Estudos recentes mostraram que C16 estimula angiogênese, migração, atividade de protease e metástase (KURATOMI et al., 2002; NOMIZU et al., 1997; PONCE et al., 2003; PONCE et al., 2003; PONCE et al., 2001). Contudo, os efeitos de C16 em tumores de glândula salivar e os mecanismos regulatórios envolvidos ainda não foram elucidados.

Nesse trabalho estudamos os efeitos de C16 na migração, invasão e secreção de protease nas células CAC2. Ainda, foi objetivo do trabalho analisar os mecanismos regulatórios envolvidos nesses processos. Para tanto células foram cultivadas na presença de C16 e submetidas a diferentes ensaios que possibilitaram avaliar se o peptídeo seria capaz de induzir as atividades de migração, invasão e secreção de metaloproteinases da matriz. Analisamos também receptores e vias de sinalização relacionados aos efeitos biológicos do peptídeo C16 em células (CAC2) derivadas de carcinoma adenóide cístico humano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura abordaremos os temas envolvidos nessa tese, entre eles: 1) matriz extracelular e membrana basal, com os conceitos básicos sobre essas estruturas e descrição mais detalhada da laminina e de suas atividades biológicas; 2) Laminina-111 e peptídeo derivado C16, objeto de estudo desse trabalho; 3) Carcinoma adenóide cístico, neoplasia de interesse, originária da linhagem celular CAC2; 4) metaloproteases da matriz, enzimas fundamentais para o processo de invasão celular; 5) integrinas, receptores das proteínas da matriz extracelular.

2.1 Matriz extracelular e membrana basal

A matriz extracelular é uma rede macromolecular tri-dimensional precisamente organizada (AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998). Essa rede é composta por uma grande variedade de moléculas estruturais, como colágenos, glicoproteínas não-colágenas e proteoglicanos que são secretados localmente e estão em estreita associação com a superfície celular que os produz (MINER e YURCHENCO, 2004; YURCHENCO e O'REAR, 1994).

Acreditava-se inicialmente, que a matriz servia simplesmente como uma estrutura inerte, para estabilizar a estrutura física dos tecidos. Contudo, hoje está claro que ela é bem mais ativa e funciona como um reservatório biológico para uma variedade de componentes que desempenham um papel complexo na regulação do comportamento das células com as quais fazem contato, influenciando seu desenvolvimento, crescimento, sobrevivência, migração, transdução de sinais, forma e função (ALBERTS et al., 2004; AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998; BORG, 2004; BORNSTEIN e SAGE, 2002; COMOGLIO e TRUSOLINO, 2005; KLEINMAN et al., 2003; MOTT e WERB, 2004; PIEZ, 1997; PUPA et al., 2002; SCHENK e QUARANTA, 2003; VU, 2001).

Vale ressaltar que as diferentes funções teciduais dependem não somente da diversidade celular, mas também da diversidade da composição da matriz (VU, 2001). Outra característica importante é o fato da matriz não ser uma estrutura estática, ou seja, está em constante remodelação por ação de diferentes enzimas, especialmente as da família das metaloproteases de matriz (BORG, 2004; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; COMOGLIO e TRUSOLINO, 2005; VU, 2001).

Essa nova visão sobre o papel funcional da matriz extracelular ocorreu recentemente, por volta de 1975 (PIEZ, 1997). Antes, porém, a teoria celular era considerada a base para a vida. Observações de vários histologistas contribuíram para o fortalecimento dessa teoria, que preconizava que a vida era representada pelas células, muitas delas produtoras de fibras. Diante desse fato, a matriz extracelular deixou de ser a base da vida e passou a ser considerada como uma estrutura inerte, não reativa e puramente estrutural. A MEC seria meio ambiente passivo, destinado a fornecer suporte para as células que a criaram (PIEZ, 1997).

Somente nos últimos vinte anos é que esse pensamento começou a mudar em virtude de diversas descobertas. Entre essas descobertas destacamos interações célula-matriz durante o desenvolvimento; sítios de adesão nas proteínas da matriz, como o domínio RGD (arginina, glicina, ácido aspártico) na fibronectina (NAIDET et al., 1987; PIERSCHBACHER et al., 1983; RUOSLAHTI e PIERSCHBACHER, 1986); e receptores celulares tipo integrinas e não-integrinas para moléculas da matriz (LIOTTA, 1986; MARTIN et al., 1984). Foi demonstrado também que a MEC aprisiona fatores autócrinos e parácrinos, que podem circular ou ficar armazenados na matriz (GLEAVE et al., 1993; THORSEN e TYSNES, 1997). Adicionalmente experimentos com silenciamento de genes mostraram as funções dos componentes da matriz. Outra área de contribuição para conhecimento dessa estrutura foi o estudo doenças hereditárias do tecido conjuntivo, trazendo informações moleculares a partir dos genes que codificam proteínas da matriz (MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2001). Em resumo os dados mostraram que: 1) células produzem a matriz extracelular, 2) as células que produzem a MEC dependem dessa estrutura para regulação de seus processos biológicos (BORG, 2004; PIEZ, 1997).

Em relação aos constituintes da matriz, existem duas principais classes de macromoléculas: (1) as cadeias de polissacarídeos de uma classe denominada glicosaminoglicanos (GAGs), as quais estão normalmente ligadas a proteínas através de ligações covalentes na forma de proteoglicanos, e (2) as diversas proteínas, incluindo colágeno, elastina, fibronectina e laminina, que exercem funções adesivas e estruturais (AUMAILLEY, 1995; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; KLEINMAN e MARTIN, 2005; PAULSSON, 1987). As moléculas de proteoglicanos formam uma substância semelhante a um gel, altamente hidratada, na qual estão embebidas as fibras protéicas. Enquanto as fibras colágenas fortalecem e auxiliam na organização da matriz, as fibras de elastina, semelhantes à borracha, fornecem a resistência. Finalmente, muitas proteínas da matriz auxiliam as células a aderirem aos locais apropriados (ALBERTS et al., 2004; BORG, 2004).

Os colágenos são as proteínas mais abundantes da matriz extracelular. Correspondem a uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares e são responsáveis pela manutenção da integridade estrutural dos vertebrados e de diversos outros organismos (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; PIEZ, 1997). Colágenos são sintetizados principalmente por células da matriz extracelular, representadas por fibroblastos, miofibroblastos, osteoblastos e condrócitos. Alguns colágenos também são sintetizados por células parenquimais adjacentes ou de revestimento tais como as epiteliais, endoteliais e do mesotélio (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

Uma propriedade do colágeno é a formação de polímeros altamente organizados, sendo que a sua maioria possui uma distribuição específica (AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998). Cada molécula de colágeno é formada por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α . Elas se encontram entrelaçadas formando uma fita tripla helicoidal, um tipo de corda supertorcida. Até o momento cerca de 34 cadeias α de colágeno diferentes já foram identificadas, cada uma codificada por um gene específico e cerca de 20 tipos

de moléculas de colágeno foram encontradas (ALBERTS et al., 2004; AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

No âmbito ultraestrutural, a organização geral da matriz extracelular exibe dois principais domínios, que são claramente identificados: 1) a matriz intersticial e 2) a membrana basal. A principal característica desses dois domínios é a sua estrutura básica definida por um "esqueleto" de colágeno, contudo as moléculas de colágeno que formam esse "esqueleto" são bastante diferentes, assim como sua arquitetura tridimensional. A matriz intersticial apresenta colágenos tipicamente fibrilares, como colágeno I (BIRK et al., 1997; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; KADLER et al., 1996). A membrana basal é formada por colágeno IV, isoforma colagênica especializada em formar redes (ALBERTS et al., 2004; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003). As glicoproteínas adesivas, incluindo a laminina, e os proteoglicanos aderem ao "esqueleto" de colágeno e interagem com as células localizadas na matriz ou adjacentes a ela (ALBERTS et al., 2004; BORNSTEIN e SAGE, 2002; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

A membrana basal é uma estrutura especializada da matriz extracelular. É uma fina camada de proteínas extracelulares que possuem íntimo contato com células de vários tecidos. Além de situar-se adjacente às células epiteliais, a membrana basal também se encontra recobrindo outras células, como as do mesotélio, músculos, células de Schwann e adipócitos (MALINDA e KLEINMAN, 1996; MINER e YURCHENCO, 2004; WEEKS et al., 1998; YURCHENCO, 1990; YURCHENCO et al., 2004; YURCHENCO e O'REAR, 1994; YURCHENCO et al., 1985; YURCHENCO e WADSWORTH, 2004).

A membrana basal possui funções mecânicas de suporte, ancoragem celular e compartimentalização de tecidos. Em certas localizações, como no glomérulo renal e alvéolos pulmonares, atua como um filtro altamente seletivo para sais e pequenas moléculas (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000). Desempenha ainda outras atividades, sendo capaz de determinar a polaridade celular, influenciar o metabolismo das células, organizar as proteínas na membrana plasmática, promover sobrevivência celular e proliferação e, atuar como vias para a migração celular (ALBERTS et al., 2004; SASAKI et al., 2004). Por último, está envolvida na diferenciação celular desde o

desenvolvimento embrionário (AUMAILLEY, 1995; AUMAILLEY e KRIEG, 1996; HUTTENLOCHER et al., 1995; TIMPL, 1996; TIMPL e BROWN, 1996).

Estruturalmente a membrana basal madura é constituída, em sua maior parte, por moléculas de colágeno organizadas em rede (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; SASAKI et al., 2004). Dentre os diferentes tipos de colágeno, existem os formadores de rede, representados pelos colágenos IV e VII (ALBERTS et al., 2004; AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; KLEINMAN et al., 1983). É justamente o colágeno IV que forma a rede da membrana basal, sendo sintetizado em um esforço conjunto entre as células do estroma e células parenquimais ou de revestimento (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

Juntamente com o colágeno IV, a laminina representa um importante componente da membrana basal (COOPER et al., 1981; MARTIN e TIMPL, 1987; SASAKI et al., 2004). Ambos possuem múltiplas isoformas que se organizam entre si formando grandes redes (YURCHENCO et al., 2004). Essas redes são conectadas por nidogênio, que também se liga a outros componentes, como perlecan (AUMAILLEY, 1995; AUMAILLEY e KRIEG, 1996; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; MARTIN e TIMPL, 1987; TIMPL e BROWN, 1994; TIMPL et al., 1979; TIMPL

Laminina é a glicoproteína mais abundante na membrana basal, é um componente estrutural e também biologicamente ativo. Das moléculas da membrana basal, é a primeira detectada durante o processo de embriogênese (MARTIN e TIMPL, 1987; SASAKI et al., 2004). Ela foi isolada na sua forma intacta por Timpl *et al* em 1979, em um tipo de neoplasia de camundongo que produz uma grande quantidade de membrana basal, o tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Através de tampões neutros, os autores conseguiram extrair quantidade substancial de proteínas não-colágenas, dentre elas uma glicoproteína de grande peso molecular que foi denominada laminina.

A molécula de laminina é heterotrimérica, formada por três cadeias, chamadas de α , $\beta e \gamma$, que se organizam em uma estrutura cruciforme. Essa organização tridimensional dá origem a três braços curtos e a um braço longo.

Os braços curtos são compostos por partes de uma única cadeia, enquanto que o braço longo é formado por partes de cada das três cadeias, que estão unidas através de um entrelaçamento entre elas (AUMAILLEY et al., 2005; MARTIN e TIMPL, 1987; MINER e YURCHENCO, 2004; YURCHENCO e O'REAR, 1994). Análises com microscopia eletrônica mostraram que a laminina é uma glicoproteína de múltiplos domínios, possuindo diversos segmentos semelhantes a espetos e estruturas globulares (MARTIN e TIMPL, 1987; MINER e YURCHENCO, 2004).

As cadeias de laminina foram isoladas em culturas celulares de teratocarcinoma Aumailley (CHUNG et al., 1979; MARTIN e TIMPL, 1987). Já foram identificados cinco diferentes genes para a cadeia α , quatro para a β e três para a cadeia γ , sendo que as cadeias $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\gamma 3$ podem existir em diferentes isoformas por *splicing* alternativo (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; MINER e YURCHENCO, 2004). A união das diferentes cadeias α , β e γ poderia resultar em 45 possíveis combinações heterotriméricas, isso sem considerar as variantes de *splicing*. Contudo, o número real de combinações é bem inferior. Isso ocorre devido a restrições de união entre algumas cadeias. A cadeia $\gamma 2$, por exemplo, nunca foi encontrada junto à cadeia $\beta 1$ (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000). Até o momento, um total de 16 isoformas de laminina foi encontrado. Hoje essas isoformas constituem a família de lamininas, e acredita-se que outras possam existir, mas ainda não foram isoladas (MALINDA e KLEINMAN, 1996; MINER e YURCHENCO, 2004; PONCE et al., 2001).

A maioria das isoformas de laminina possui os braços curtos formados por dois domínios globulares e dois segmentos semelhantes a espetos. Já o braço longo termina em um grande domínio globular, o qual apresenta uma estrutura complexa formada por uma seqüência de cinco domínios globulares menores, denominados módulos LG (LG1-LG5) na região C-terminal da cadeia α (AUMAILLEY et al., 2005; BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; MARTIN e TIMPL, 1987; MINER e YURCHENCO, 2004; TIMPL et al., 2000; YURCHENCO e O'REAR, 1994). Nos domínios globulares estão vários sítios para ligação em integrinas (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003). As isoformas de laminina são sintetizadas por uma extensa variedade de células, como as musculares lisas, de tecido ósseo, de músculo cardíaco, nervosas, endoteliais e de medula óssea. Pode-se considerar que todas as células epiteliais sintetizam laminina, que se deposita principalmente na membrana basal, mas não exclusivamente (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003).

Foi proposta uma nova classificação para as diferentes isoformas de laminina por Aumailley et al. (2005). Anteriormente as isoformas eram classificadas de acordo com a ordem da sua descoberta. Dessa forma, surgiram os termos laminina-1, laminina-2 e assim por diante. No entanto, com exceção da laminina-1, era difícil relacionar a laminina com suas diferentes cadeias α , β e γ . Aumailley et al. propuseram classificar as isoformas com numeração composta que represente as cadeias. De acordo com a proposta a laminina-1 passaria a ser chamada de laminina-111, pois possui cadeias $\alpha 1\beta 1\gamma 1$. Por outro lado, laminina-5 passaria a ser denominada laminina-332, devido a suas cadeias $\alpha 3\beta 3\gamma 2$.

A tabela a seguir mostra as isoformas da laminina, suas cadeias e as integrinas com as quais se ligam, assim como a evolução de sua nomenclatura (AUMAILLEY et al., 2005; BURGESON et al., 1994).

Classificação	Classificação	Cadeias	Receptores (integrinas)
antiga	Nova		
Laminina-1	111	α1β1γ1	α1β1, α2β1, α6β1, α6β4, α7 <u>β</u> 1
Laminina-2	211	α2β1γ1	α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4, α 7 β 1
Laminina-3	121	α1β2γ1	ND
Laminina-4	221	α2β2γ1	Similar à laminina-2
Laminina-5	332	α3β3γ2	α 3 β1, α6β4, α 6 β1
Laminina-6	311	α3β1γ1	ND
Laminina-7	321	α3β2γ1	ND
Laminina-8	411	α4β1γ1	α6β1
Laminina-9	421	α4β2γ1	ND
Laminina-10	511	α5β1γ1	α3β1, α6β1
Laminina-11	521	α5β2γ1	α3β1, α6β1
Laminina-12	213	α2β1γ3	ND
Laminina-13	323	α3β2γ3	ND
Laminina-14	423	α4β2γ3	ND
Laminina-15	523	α5β2γ3	ND

Tabela 1 – Isoformas da laminina, suas respectivas cadeias e integrinas ligantes (adaptado de (AUMAILLEY et al., 2005; BURGESON et al., 1994; KUTLESA et al., 2002).

ND Não determinado

Estudos mostraram que os componentes da membrana basal formam uma estrutura integrada, na qual existem interações fortes e específicas (MARTIN e TIMPL, 1987; MINER e YURCHENCO, 2004; WOODLEY et al., 1983). A laminina interage com ela mesma e com todos os demais componentes da membrana basal, como o colágeno IV, entactina, nidogênio e proteoglicanos (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; MALINDA e KLEINMAN, 1996; MARTIN e TIMPL, 1987; MINER e YURCHENCO, 2004; WOODLEY et al., 1983).

A laminina contribui para a organização e arquitetura supramolecular final da membrana basal (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000). Devido ao seu tamanho e forma ela é capaz de atravessar a membrana basal e se ligar a várias moléculas da superfície celular, que incluem receptores de alta afinidade e outros tipos de ligantes, como proteoglicanos de heparan sultafo (MARTIN e TIMPL, 1987; WOODLEY et al., 1983). Portanto, a laminina além de desempenhar papel na formação da membrana basal, também está envolvida na sua organização (MALINDA e KLEINMAN, 1996). Vale ressaltar que na ausência de laminina não há desenvolvimento da membrana basal (YURCHENCO et al., 2004; YURCHENCO e WADSWORTH, 2004).

Laminina é uma molécula com grande atividade biológica, o que vem sendo demonstrado por trabalhos realizados *in vitro* e *in vivo*. A primeira atividade biológica demonstrada foi a adesão de células epiteliais malignas e normais à laminina (MALINDA e KLEINMAN, 1996). Também foi observada a habilidade em estimular movimentos celulares, tendo sido demonstrado que a capacidade de células tumorais migrarem à medida que invadem tecidos normais envolve moléculas quimiotáticas. De fato, laminina mostrou atividade quimiotática quando em solução (MALINDA e KLEINMAN, 1996; MARTIN e TIMPL, 1987). Outras funções da laminina são: promoção de espraiamento celular, proliferação, crescimento de neuritos, indução de metástase tumoral, secreção de proteases e angiogênese (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; MALINDA e KLEINMAN, 1996; MARTIN e TIMPL, 1987; PONCE et al., 2001).

Aspecto relevante da laminina e também de outras moléculas da matriz extracelular é a capacidade que pequenas seqüências de aminoácidos, derivadas dessas moléculas, têm de estimular funções biológicas. Essas seqüências são conhecidas como peptídeos bioativos e algumas funções são as mesmas promovidas pela proteína íntegra (HANDSLEY e EDWARDS, 2005; SCHENK e QUARANTA, 2003; VOGEL, 2006; YAMASHITA et al., 2008).

O termo críptico foi proposto para significar aquilo que está escondido, mascarado ou não reconhecido. No contexto da matriz extracelular, críptico se

refere aos sítios funcionais que estão escondidos dentro da estrutura das macromoléculas e que, portanto, não estão expostos na superfície da proteína quando na sua forma intacta (DAVIS et al., 2000; SCHENK e QUARANTA, 2003).

Trabalhos vêm mostrando que alterações nas moléculas da matriz extracelular podem gerar novos sinais para as células e influenciar importantes eventos biológicos (DAVIS et al., 2000). Os mecanismos que regulam a exposição de sítios crípticos representam uma etapa relevante no controle desses vários eventos. Pelo menos cinco mecanismos envolvidos na geração de sítios já foram descritos. Todos apresentam uma etapa em comum, a mudança nas moléculas da matriz extracelular, podendo essa ser estrutural ou conformacional (DAVIS et al., 2000; VOGEL, 2006).

Para que essa mudança possa acontecer, um dos seguintes processos provavelmente está envolvido: (1) degradação enzimática por ação proteolítica de enzimas denominadas decriptases, (2) ligação heterotípica (adsorção) a outras moléculas o que levaria a uma mudança conformacional dessas moléculas, (3) multimerização (por exemplo, organização de moléculas em arranjo), (4) forças mecânicas mediadas por células, e (5) denaturação (DAVIS et al., 2000; SCHENK e QUARANTA, 2003).

A hipótese mais aceita para explicar o porquê de esses sítios ficarem escondidos na estrutura das moléculas é que provavelmente eles fazem parte de uma estratégia adotada durante a evolução para controlar diferentes atividades celulares. Atuariam como fontes de instrução a serem usadas pelas células durante processos como organização tecidual, reparação e remodelação. Dessa forma, existe a vantagem dessas fontes permanecerem escondidas até que sua presença seja necessária. Além disso, essas instruções não necessitariam de inibidores ou bloqueio de uma atividade quando não forem necessárias (SCHENK e QUARANTA, 2003).

2.2 Laminina-111 e peptídeo derivado C16

Como o peptídeo que estudamos nesse trabalho é derivado da cadeia γ 1 da laminina-111, faremos uma breve revisão sobre sua estrutura molecular e funções.

Dentre as isoformas da laminina mostradas anteriormente, a laminina-111 (antiga laminina-1, 900 kDa) formada pelas cadeias α 1 (400kDa), β 1 (200kDa) e γ 1 (200kDa) é a mais extensivamente estudada e foi a primeira laminina identificada, estruturalmente analisada e seqüenciada (AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; EKBLOM et al., 1998; POWELL e KLEINMAN, 1997; TIMPL e BROWN, 1994).

É considerada a mais importante nos estágios iniciais do desenvolvimento e sua formação é essencial para que as outras etapas do processo possam acontecer (SASAKI et al., 2004; TIMPL e BROWN, 1994). Evidências genéticas recentes indicam uma hierarquia na formação da membrana basal, com a polimerização da laminina-111 atuando como um "esqueleto" para o recrutamento dos demais componentes (SASAKI et al., 2004). Enquanto que a ausência de moléculas como perlecan, ou colágeno IV, ou nidogênio permite implantação normal do embrião, camundongos que não expressam a cadeia γ 1 da laminina-111 morrem após essa etapa do desenvolvimento (SASAKI et al., 2004).

A cadeia α 1 é a mais conhecida e estudada cadeia da laminina-111. Está presente no blastocisto e também em uma variedade de locais durante as etapas tardias do desenvolvimento, contudo é amplamente ausente nos tecidos adultos, podendo ser encontrada no rim (COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; EKBLOM et al., 1998; MINER e YURCHENCO, 2004). Trabalho realizado por Falk et al. (1999) analisou a distribuição da cadeia α 1 em tecidos normais de camundongos adultos. Os autores verificaram que a expressão dessa cadeia está largamente restrita ao epitélio, não sendo observada sua presença em músculos, células adiposas ou de Schwann. Uma expressão proeminente foi notada nos túbulos proximais do rim e na membrana basal de ovários e testículos. Contudo, os autores ressaltaram que evidências sugerem que
tecidos adultos, como o epitélio, endotélio, tecido endócrino, nervoso e muscular reagem aparentemente de maneira positiva à laminina-111.

Já a cadeia γ 1 está presente na maioria das isoformas de laminina, exceto na laminina-332 (antiga laminina-5) (BURGESON et al., 1994; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; EKBLOM et al., 1998; NOMIZU et al., 1997; PONCE e KLEINMAN, 2003). Essa cadeia apresenta ligação com alta afinidade ao nidogênio, que está presente em todas as membranas basais. A interação acontece através de repetições EGF-"like" localizadas no braço curto da cadeia e parece ser particularmente interessante, uma vez que, anticorpos que bloqueiam a ligação mostraram inibir de maneira significativa a morfogênese de pulmão, glândula salivar e rim (EKBLOM et al., 1998; EKBLOM et al., 1994; NOMIZU et al., 1997).

Observações com microscopia eletrônica indicaram que as três cadeias que formam a estrutura cruciforme da laminina-111 apresentam três braços curtos, sendo que um possui 48nm de comprimento e dois possuem 34nm, com três e dois domínios globulares, respectivamente. O braço longo tem 77nm e termina em um grande domínio globular (AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998).

O modelo estrutural proposto foi baseado na correlação entre a análise química da proteína, as observações com microscopia eletrônica e estudo de fragmentos proteolíticos purificados. Cada cadeia começa com um domínio globular N-terminal (LN), seguido por uma seqüência de domínios semelhantes a fatores de crescimento epidermal (LE) (AUMAILLEY et al., 2005). Os braços curtos são formados separadamente, a partir da região amino-terminal das cadeias, com dobramento globular dos domínios IV e VI, e alinhamento em formato de espeto dos motivos LE (domínios III e V). O braço longo resulta do dobramento conjunto dos domínios carboxi-terminais I e II das cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ para o interior de uma α -hélice enovelada. Os domínios globulares adicionais da cadeia $\alpha 1$ são separadamente dobrados em cinco glóbulos na terminação carboxílica (AUMAILLEY et al., 2005; AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998).

A dissecção bioquímica da molécula relatou que algumas das funções da laminina são específicas a partes dessa grande glicoproteína. Isso porque diferentes partes possuem efeitos diferentes nas células, sendo que alguns domínios, por serem crípticos, só ficam disponíveis após a clivagem da molécula por proteases (FAISAL KHAN et al., 2002). Além de seu papel no desenvolvimento, a laminina-111 também é uma molécula adesiva para a maioria dos tipos celulares, promove espraiamento, proliferação, crescimento de neuritos, metástase tumoral, secreção de protease e angiogênese (EKBLOM et al., 2003; KANEMOTO et al., 1990; KURATOMI et al., 2002; NOMIZU et al., 2000; PONCE et al., 2003; PONCE et al., 2003; PONCE et al., 2003; PONCE et al., 2003; WEEKS et al., 1999).

A resposta de células nervosas à laminina-111 representa uma das principais atividades dessa molécula. Alguns autores relataram que a capacidade em estimular crescimento de neuritos *in vitro* é significativa e pode refletir uma importante atividade durante o desenvolvimento neuronal. Isso é apoiado pela observação de distribuição, tanto espacial quanto temporal, de laminina-111 durante o desenvolvimento do cérebro. Adicionalmente, ela é capaz de promover reparação no sistema nervoso periférico e central (POWELL e KLEINMAN, 1997).

Células derivadas de carcinoma são capazes de sintetizar, depositar e utilizar diferentes isoformas de laminina, como a 111 (PATARROYO et al., 2002). Células mioepiteliais derivadas de tecido glandular de mama normal atuam mantendo a correta polaridade celular através da sua habilidade em sintetizar laminina-111 (GUDJONSSON et al., 2002). Contato direto de células tumorais com endotélio através de uma matriz amorfa rica em lamininas livres (distintas de lamininas integradas a uma membrana basal organizada) é comumente observado em melanomas humanos (LUGASSY et al., 1997). O resultado desse contato é a promoção de migração de células derivadas do tumor em contato com os vasos (LUGASSY et al., 1997; PATARROYO et al., 2002).

Foi observado também o papel da laminina na diferenciação de ácinos em linhagem celular derivada da glândula submandibular humana (HSG).

Anticorpos contra componentes específicos da membrana basal reconstituída (Matrigel) e outros contra moléculas dos receptores celulares foram usados para identificar componentes envolvidos na diferenciação dessas células. Os autores concluíram que entre os componentes do Matrigel, a laminina-111 e o TGF- β 3 contribuem para o desenvolvimento acinar nas células HSG (HOFFMAN et al., 1996).

Devido às várias atividades biológicas estimuladas pela laminina, surgiu o interesse em estudar os diferentes sítios ativos da molécula e com quais atividades cada um estaria relacionado. Para realizar esses estudos, foram utilizados clones das cadeias de laminina, seqüências de peptídeos correspondentes a vários domínios estruturais (fragmentos proteolíticos e peptídeos sintéticos) e também anticorpos.

Diversos peptídeos vêm sendo identificados através de varreduras sistemáticas de seqüências biologicamente ativas das diferentes cadeias da laminina-111. Uma colaboração entre a Universidade de Kyoto no Japão e um grupo de cientistas do NIDCR, NIH, USA foi estabelecida para pesquisar e identificar seqüências biologicamente ativas na molécula de laminina-111. Foi feita varredura sistemática de seqüências, com posterior síntese de 560 peptídeos das três cadeias da laminina-111 (α 1, β 1 e γ 1), sendo 208 peptídeos da cadeia α 1, 187 peptídeos da cadeia β 1 e 165 da cadeia γ 1. Depois de sintetizados, o próximo passo foi avaliar se essas seqüências tinham capacidade de adesão. Dentre estes 560 peptídeos, apenas 51 foram identificados como seqüências adesivas, distribuídos da seguinte forma: 25 da cadeia α 1, 14 da cadeia β 1 e 12 da cadeia γ 1 (NOMIZU et al., 1998; NOMIZU et al., 2000; NOMIZU et al., 1997; NOMIZU et al., 2001).

Outro trabalho analisou o domínio globular da cadeia α1. Foram seqüenciados e sintetizados 113 peptídeos e, um total de 19 foi analisado quanto à capacidade de promover adesão e de inibir o espraiamento celular à laminina-111. Ao final, cinco peptídeos ativos foram identificados e em seguida testados em atividades biológicas adicionais (NOMIZU et al., 1995). Entre os peptídeos analisados, AG73 (RKRLQVQSIRT) localizado no quarto domínio globular, mostrou possuir a mais forte atividade adesiva, bem como um efeito

inibitório dose-dependente sobre o espraiamento celular à laminina (NOMIZU et al., 1995). Além dessas atividades, já foram descritos como efeitos do AG73 crescimento de neuritos, desenvolvimento de ácinos em células de glândula salivar, estímulo de secreção de proteases, além de efeito metastatizante (HOFFMAN et al., 1998; KADOYA et al., 1998; POWELL et al., 1998; RICHARD et al., 1996; WEEKS et al., 1998).

Nosso laboratório demonstrou que esse peptídeo é capaz de regular a morfologia de células derivadas de neoplasias de glândula salivar (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; MELO, 2004; OLIVEIRA, 2004). Adicionalmente, AG73 promoveu atividade de adesão e estimulou secreção de metaloproteases de matriz através da interação com os receptores syndecan-1 e integrina β 1 em linhagens celulares derivadas de carcinoma adenóide cístico e mioepitelioma humanos (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

Outro peptídeo da cadeia α1 é o SIKVAV, dentre os peptídeos derivados da laminina-111 é o mais conhecido e estudado. Está localizado no domínio E8 no final do braço longo da cadeia, logo acima do domínio globular (TASHIRO et al., 1989). SIKVAV estimula atividades biológicas iguais às promovidas pela molécula de laminina intacta, como adesão, migração, crescimento de neuritos e indução de metástase experimental (GRANT et al., 1992; KANEMOTO et al., 1990; NOMIZU et al., 1992; SCHNAPER et al., 1993; TASHIRO et al., 1989).

Trabalho envolvendo SIKVAV e células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano (células CAC2) mostrou que o peptídeo induz a formação de espaços pseudocísticos quando as células são crescidas em preparados tridimensionais e que esse fenômeno pode estar relacionado com a secreção de MMPs (FREITAS et al., 2004). Em um estudo mais recente foi verificado que SIKVAV estimula, de maneira dose-dependente, a secreção de MMP2 e MMP9 pelas células CAC2. Além disso, a regulação dessa atividade parece envolver os receptores do tipo integrinas α 6, α 3 e β 1 e a via de ERK 1/2 (FREITAS et al., 2007).

Em relação à cadeia γ1 da laminina, embora esteja presente na maioria das isoformas, pouco se sabe sobre suas funções e sítios biologicamente ativos.

Nomizu et al. (1997) realizaram varreduras sistemáticas de seqüências e ensaios de adesão e revelaram 20 seqüências ativas dessa cadeia. Dentre elas, quatro peptídeos mostraram forte atividade adesiva, sendo então avaliados quanto à capacidade de estimular outras atividades biológicas. O peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF), presente no primeiro domínio globular, foi identificado como uma dessas seqüências ativas e mostrou ter forte atividade adesiva para as células de fibrossarcoma (HT-1080) e melanoma (B16-F10) quando comparado ao peptídeo AG73 e à laminina-111. O trabalho ainda revelou que os aminoácidos YVRL são críticos para que C16 possa promover seus efeitos.

Foram descritas ainda como atividades desse peptídeo promoção de adesão em células HSG e endoteliais, efeito na formação de tubos semelhantes a capilares, crescimento de neuritos, diminuição na formação e diferenciação de ácinos, bloqueio de adesão celular a diferentes substratos, como laminina-111, colágeno-I, fibronectina e plástico. Esse último efeito sugere que C16 possa agir via receptor comum a esses substratos, por exemplo, receptor do tipo integrina (NOMIZU et al., 1997; PONCE et al., 1999; PONCE et al., 2001; RIALAS et al., 2000).

Trabalhos mostraram que C16 representa um potente sítio angiogênico da cadeia γ1 (PONCE e KLEINMAN, 2003; PONCE et al., 1999; PONCE et al., 2001). Além de promover adesão de células endoteliais, foi capaz de estimular brotamento *in vitro* dessas células a partir de anéis aórticos. Ensaios realizados *in vivo* confirmaram o efeito angiogênico de C16. Contudo, o peptídeo não foi capaz de estimular migração e proliferação de células endoteliais (PONCE e KLEINMAN, 2003).

A degradação da matriz extracelular representa uma das primeiras etapas durante o processo de invasão tumoral, cicatrização e remodelação tecidual (GHOSH e STACK, 2000; MOTT e WERB, 2004; SCHENK e QUARANTA, 2003). A laminina, quando intacta, não possui efeito

angiogênico, entretanto durante eventos de degradação da matriz, ela sofre clivagem e isto permite que seqüências ativas se tornem expostas, induzindo uma resposta angiogênica (PONCE e KLEINMAN, 2003).

Ainda não está claro se C16 é um sítio críptico *in vivo*, se for o caso, ele se tornaria exposto durante o desenvolvimento embrionário ou então por ação de protease sobre a membrana basal. Como receptores para C16, em células endoteliais, foram identificadas as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, sendo que a primeira já foi descrita como importante receptor no processo de angiogênese (PONCE e KLEINMAN, 2003; PONCE et al., 1999; PONCE et al., 2001).

Trabalho realizado por Kuratomi et al. (2002) mostrou que o peptídeo C16 induziu um aumento significativo de metástase pulmonar de células de melanoma (B16-F10). Na verdade, esse peptídeo se mostrou o único sítio da cadeia γ1 ativo para colonização pulmonar. Adicionalmente, o peptídeo estimulou migração e secreção de MMP9 pelas células. Embora os mecanismos envolvidos nesses processos não tenham sido descritos pelos autores, eles acreditam que C16 desempenhe papel em várias etapas da metástase, como adesão, migração, invasão (secreção de protease) e geração de aporte sanguíneo. Contudo, C16 não parece estimular proliferação celular.

Em trabalho mais recente, Lugassy et al. (2007) verificaram que C16 aumenta a migração extra-vascular angiotrópica de melanomas. Esse tipo de migração é diferente da difusão intravascular e tem sido descrita como um potente mecanismo adicional na disseminação do melanoma, no qual as células tumorais migram ao longo da superfície externa dos vasos. Diante desses resultados, os autores sugeriram que o peptídeo pode se tornar um alvo molecular na prevenção de metástase tumoral em melanomas.

A capacidade de C16 estimular migração já foi demonstrada em diferentes tipos celulares. Entretanto, Malinda et al. (2008) resolveram testar *in vivo* os efeitos de C16 no processo de cicatrização. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que o peptídeo estimulou migração de fibroblastos, contração de bordas da ferida, reepitelialização e angiogênese. É possível que C16 desempenhe um papel inicial no processo de cicatrização e à medida que a ferida progride passe a ter um efeito mais regulatório, na maturação da

mesma. Como proposta final, os autores acreditam que C16 tem potencial para ser desenvolvido como um novo agente terapêutico nos processos de cicatrização.

2.3 Carcinoma adenóide cístico

Vem sendo sugerido que a matriz extracelular desempenha um importante papel como fator regulador das diferenças fenotípicas em tumores de glândula salivar (CAPUANO e JAEGER, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2001; FRANCA et al., 2000; FRANCA et al., 2001; FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; JAEGER, M. M. et al., 1997; JAEGER, R. G. et al., 1997). Embora essas neoplasias sejam raras, compreendendo em torno de 3% de todas as lesões que acometem cabeça e pescoço, é considerada uma área relevante no campo da patologia oral e maxilofacial (ITO et al., 2005; NEVILLE, 2004; SUBHASHRAJ, 2008).

Em trabalho de Ito et al. (2005) foi realizada uma análise epidemiológica dos tumores de glândula salivar no Brasil. Um total de 496 casos de neoplasias localizadas tanto em glândulas salivares maiores quanto em menores foram resgatados e analisados. Desse número, 67,5% dos casos foram diagnosticados como benignos e 32,5% como malignos. O carcinoma adenóide cístico foi o quarto tumor mais comum (7,9%) e o segundo maior no grupo de tumores malignos, com 24,2% dos casos diagnosticados.

Trabalho semelhante foi realizado por Subhashraj (2008), na Índia, onde 684 casos de tumores em glândula salivar foram analisados e a neoplasia maligna mais freqüente foi o carcinoma adenóide cístico, representando 25%.

O carcinoma adenóide cístico foi descrito inicialmente por Billroth em 1856, sob a denominação de cilindroma (MYLIUS, 1960). Em seguida, nomes alternativos foram propostos, como basalioma, adenocarcinoma do tipo cilindroma, carcinoma pseudoadenomatoso de células basais, adenomioepitelioma, adenocarcinoma cribriforme (KAMAL et al., 1996; LAM e YUEN, 1996; OSBORN, 1977). O termo cilindroma retrata graficamente o padrão estrutural desse tumor, a área delimitada de mucina ou material hialino com ilhas epiteliais (FRIEDMAN e SCHWARTZ, 1974). Embora esse termo ainda seja usado, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o termo "carcinoma adenóide cístico" o qual foi primeiramente utilizado por Ewing em 1928 (EL-NAGGAR e HUVOS, 2005).

O carcinoma adenóide cístico pode ocorrer em qualquer sítio de glândula salivar, contudo, aproximadamente 50% se desenvolvem em glândulas salivares menores. Sua maior incidência é no palato seguido, em ordem decrescente de ocorrência, por língua, lábios, assoalho bucal, mucosa jugal e trígono retromolar (CHOMETTE et al., 1982; LOYOLA et al., 1995; NEVILLE, 2004; SUBHASHRAJ, 2008). Nesses sítios, o tumor adquire um comportamento mais agressivo (SWASH, 1971). Com relação à incidência em glândulas maiores, a parótida é a mais afetada seguida pelas glândulas submandibular e sublingual (LOYOLA et al., 1995).

Trabalho realizado por Loh et al. (2008) envolveu um estudo retrospectivo de 171 pacientes acometidos por neoplasias malignas em glândulas salivares menores. As análises mostraram que 44,4% dos tumores primários estavam localizados na cavidade oral e 46,8% era carcinoma adenóide cístico. Outro levantamento feito por Ethunandan et al. (2008) incluiu pacientes acometidos por tumores benignos ou malignos na região de glândula submandibular. No levantamento realizado pelos autores, adenoma pleomórfico foi a neoplasia benigna mais freqüente, enquanto que o carcinoma adenóide cístico o tumor maligno mais comum.

O carcinoma adenóide cístico apresenta diferentes subtipos histológicos. No padrão cribriforme as células tumorais se encontram distribuídas em uma forma semelhante a "crivo" ou "queijo suíço" ao redor de espaços que lembram lúmen. Esses espaços são conhecidos como espaços pseudo-císticos e contêm material hialino ou mucoso. Os espaços pseudocísticos são envolvidos por uma lâmina basal comum, formando grandes unidades (CHAUDHRY et al., 1986; DARDICK, 1996; SEIFERT e SOBIN, 1992). Esse é o padrão mais clássico e com aspecto melhor reconhecido (CHAUDHRY et al., 1986; NEVILLE, 2004).

Já no padrão tubular as células tumorais formam estruturas tubulares ou ductiformes com um lúmen central. Diferentemente das unidades do subtipo

cribriforme, essas estruturas são menores e delgadas (CHAUDHRY et al., 1986; NEVILLE, 2004).

A neoplasia também pode se apresentar no padrão sólido. Nesse, os cordões ou lençóis apresentam-se como compactos de células epiteliais com poucos espaços ductais ou pseudo-císticos. Diferente dos demais padrões, no tipo sólido é possível observar pleomorfismo celular, atividade mitótica e necrose focal nos centros das ilhas do tumor (CHAUDHRY et al., 1986; DARDICK, 1996; NEVILLE, 2004; RAITZ et al., 2003; SEIFERT e SOBIN, 1992). Esse último padrão é considerado o mais agressivo. Vale ressaltar que, em um mesmo tumor os diferentes subtipos histológicos podem estar associados em várias proporções. O diagnóstico histopatológico dessa neoplasia em algumas situações é complicado devido ao grande polimorfismo da lesão (CHOMETTE et al., 1982; SEIFERT e SOBIN, 1992).

Estudos indicam que o carcinoma adenóide cístico se origina a partir de células de reserva do ducto intercalado. Também estão presentes no tumor células secretoras, mioepiteliais e pluripotentes/células tronco (EVERSOLE, 1971; REGEZI e BATSAKIS, 1977). Dentre elas, as células mioepiteliais são encontradas em cada 9 de 12 tumores (CHAUDHRY et al., 1986).

Em relação aos sinais e sintomas, dor local é um aspecto relatado por 50% dos pacientes, provavelmente devido à infiltração perineural do tumor. Geralmente quando o sítio da doença é a glândula parótida, pode haver paralisia, devido ao envolvimento do nervo facial na lesão (FRIEDMAN e SCHWARTZ, 1974; SEIFERT e SOBIN, 1992). A invasão perineural foi definida por van der Waal et al., 1990 como células tumorais que envolvem feixes nervosos em bainhas contínuas e concêntricas.

Não é um tumor encapsulado e seu crescimento é lento e insidioso, com tendência a desenvolver metástase à distância e recorrência local, mesmo após tratamento. Por essa razão os pacientes precisam ser acompanhados por longos períodos (BIANCHI et al., 2008; FRIEDMAN e SCHWARTZ, 1974; NEVILLE, 2004; SIMPSON et al., 1984). O tratamento na maioria dos casos envolve combinação de excisão cirúrgica e radioterapia. Alguns autores defendem a hipótese de que a radioterapia pós-operatória pode oferecer alguma vantagem na sobrevida de pacientes de alto-risco, como aqueles que

apresentam ressecção com margens positivas para o tumor, estágio avançado da doença ou infiltração profunda, em ossos, cartilagem ou músculos (GARDEN et al., 1995; MACIEJEWSKI et al., 2002; RENEHAN et al., 1999). Grandes lesões ou tumores que já metastatizaram podem não ter indicação para cirurgia (NEVILLE, 2004; PARSONS et al., 1996).

Trabalho realizado por Huang et al. (1997) avaliou os fatores que influenciam a taxa de sobrevida de pacientes diagnosticados com carcinoma adenóide cístico. Os autores concluíram que o sítio do tumor, estágio clínico e subtipo histológico são fatores importantes no prognóstico. As lesões localizadas no palato ou parótida, em estágio clínico inicial, de subtipo histológico tubular e sem envolvimento de nervos foram as que tiveram melhores prognósticos, por outro lado, as localizadas em glândula submandibular e língua, estágio avançado, subtipo sólido e envolvimento de nervos apresentaram pobre prognóstico.

Bianchi et al. (2008) também avaliaram quais fatores são os mais importantes e que influenciam o desenvolvimento da doença. Os autores realizaram um estudo retrospectivo de 67 pacientes acometidos por carcinoma adenóide cístico em glândulas salivares menores e concluíram que o estágio clínico do tumor e as condições das margens cirúrgicas são relevantes na determinação do prognóstico. Já o envolvimento de nódulos cervicais é um fator preditivo para mortalidade.

Uma característica importante desse tumor foi observada por Cheng et al. (1992). No estudo, marcações para as principais proteínas da membrana basal foram realizadas em amostras de carcinoma adenóide cístico. Foi constatada a presença abundante dessas proteínas, em especial da laminina nos espaços pseudocísticos e em todo o estroma tumoral. Também observaram uma tendência de proliferação de células tumorais em contato com a matriz extracelular, além de infiltração através de tecidos ricos em membrana basal, como nervos e vasos. Os autores concluíram que a alta afinidade do tumor por membranas basais poderia ser responsável pelo aspecto morfológico e também pelo comportamento biológico do carcinoma adenóide cístico.

Outro aspecto dessa neoplasia é a expressão de uma proeminente membrana basal, sendo possível observar um grande espessamento quando

comparada a membrana da junção dermo-epidérmica normal. Nossos estudos mostraram que esse espessamento é de até 40x na neoplasia comparado junção dermo-epidérmica (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008). Esses achados corroboram achados anteriores (VISSE e NAGASE, 2003). Vários trabalhos mostraram que diferentes componentes da membrana basal desempenham importante papel não somente na morfogênese e diferenciação de glândulas salivares normais, mas também nas características e atividades de tumores localizados nesses sítios. Dentre essas moléculas destacam-se a laminina e o colágeno tipo IV (D'ARDENNE et al., 1986; KADOYA et al., 1998; RAITZ et al., 2003; SAKU et al., 1990).

Sobre o papel de laminina, trabalhos realizados no Laboratório mostraram que a laminina-111 modula o fenótipo de células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano, células CAC2 (FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004). Células crescidas em ambiente tridimensional de gel de laminina-111 mostraram características típicas observadas na neoplasia *in vivo,* como aspecto sólido, pseudocístico e estruturas semelhantes a ductos (FREITAS e JAEGER, 2002).

Essa glicoproteína parece também ter um papel na regulação de secreção de outras moléculas da matriz extracelular pelas células CAC2. Nesse contexto, células crescidas dentro de gel de laminina-111 e analisadas através de imunofluorescência e microscopia confocal mostraram presença de procolágeno I e tenascina no interior de estruturas que são semelhantes à pseudocistos (JAEGER et al., 2008). A ocorrência desses espaços poderia ser devido à atividade de protease, com enzimas proteolíticas digerindo a matriz extracelular. De fato, células CAC2 crescidas na presença de laminina-111 expressaram MMP2 e MMP9 (FREITAS et al., 2004).

2.4 Metaloprotease de Matriz

Para que a célula tumoral promova metástase, precisa inicialmente perder as estruturas de adesão e se separar das células vizinhas. Em seguida deverá abrir caminho ao redor do estroma que a circunda e penetrar na membrana

47

basal para que possa então alcançar os vasos e chegar à circulação. Para isso, é necessária extensiva degradação de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, laminina e vários proteoglicanos (MOSCATELLI e RIFKIN, 1988; WOESSNER, 1991).

As células são capazes de realizar esses procedimentos porque são providas por uma bateria de metaloendopeptidases que são secretadas e digerem uma extensa variedade de proteínas de matriz (WOESSNER, 1991). Gross e Lapiere (1962) descreveram a partir de experimentos com cauda de girinos, o primeiro membro da família das metaloproteinases de matriz, a colagenase. Desde essa descoberta inicial, um grande número de metaloproteinases foi descrito (WOESSNER, 1991).

Baseado na semelhança estrutural, um grupo de proteases com íon zinco e resíduo metionina conservado no sítio catalítico forma a superfamília de metzincinas. Essa superfamília está dividida em quatro subfamílias de enzimas: a das serralisinas; das adamalisinas (proteína com domínios desintegrina e metaloprotease); das astracinas e das matrixinas (STAMENKOVIC, 2003).

As metaloproteases de matriz (MMPs) formam a subfamíla das matrixinas, que possui mais de 20 endopeptidases dependentes de Zn²⁺ e capazes de degradar diversos componentes da matriz extracelular (PAGE-MCCAW et al., 2007; RUNDHAUG, 2005; STAMENKOVIC, 2003). As MMPs são denominadas com um número correspondente à cronologia da descoberta, contudo, uma abordagem mais racional quanto à classificação de acordo com suas estruturas, vem sendo abordada atualmente (STAMENKOVIC, 2003).

As MMPs são subdivididas em matrilisinas, colagenases, gelatinases, estromelisinas e metaloproteinase de matriz tipo membrana (MT-MMPs) (LYNCH e MATRISIAN, 2002; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001).

Todas as matrixinas são sintetizadas na forma de prepro-enzimas e na maioria dos casos são secretadas como pro-MMPs inativas (RUNDHAUG, 2005; STAMENKOVIC, 2003). A subclasse de MMPs com estrutura mais simples é a matrilisina, que consiste de um peptídeo sinal, domínio pró-peptídico e um domínio catalítico com sítio para ligação com o zinco (LYNCH e

MATRISIAN, 2002; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001; RUNDHAUG, 2005; STAMENKOVIC, 2003). O domínio pro-peptídico, formado por 80 aminoácidos, possui uma seqüência conservada única, PRCG(V/N)PD. A cisteína presente nessa seqüência se encontra ligada ao domínio catalítico de zinco e é responsável pela manutenção da latência das pro-MMPs (RUNDHAUG, 2005). O domínio catalítico (por volta de 170 aminoácidos) contém o sítio de ligação ao zinco e também para íons cálcio, esses íons são necessários tanto para estabilidade, quanto para expressão da atividade enzimática (NAGASE e WOESSNER, 1999; RUNDHAUG, 2005).

Nas colagenases existe, em adição à estrutura básica, um domínio simples tipo hemopexina (PEX) conectado ao domínio catalítico através de uma região em dobradiça rica em prolina. Esse domínio forma uma estrutura que permite às MMPs, que clivam o colágeno, distorcerem ou abrirem os colágenos fibrilares para que então, o domínio catalítico da enzima possa clivar a molécula (RUNDHAUG, 2005). Esse domínio PEX também é necessário para ligação de MMP em outras proteínas, incluindo integrinas (RUNDHAUG, 2005). Essas enzimas degradam colágeno tipo I, II, III (colágenos intersticiais) e outras fibrilas de colágeno. Elas também clivam as cadeias α dos colágenos gerando fragmentos de 1/4 e 3/4 do tamanho da molécula original (MADSEN et al., 2007; NYBERG et al., 2003).

As estromelisinas apresentam domínios estruturais semelhantes aos das colagenases, contudo assim como as matrilisinas, possuem um amplo espectro de substratos específicos, sendo capazes de degradar várias moléculas da matriz, incluindo proteoglicanos, fibronectina e laminina (NAGASE e WOESSNER, 1999; RUNDHAUG, 2005). Fazem parte desse grupo: estromelisina-1 (MMP3), estromelisina-2 (MMP10), estromelisina-3 (MMP11), matrilisina (MMP7) (LEE e MURPHY, 2004; VIHINEN e KAHARI, 2002).

As gelatinases contêm uma região adicional de três repetições de domínios tipo II de fibronectina no sítio catalítico. Essas repetições interagem com colágeno tipo IV (presente na membrana basal), V, VII e X, além de fibronectina, elastina e laminina. Há dois tipos pertencentes a essa família: gelatinase A (72kD, colagenase tipo IV /MMP2) e gelatinase B (92 kD, colagenase tipoIV/MMP-9). A MMP9 é secretada por células epiteliais e

estocadas em grânulos secretórios de neutrófilos e eosinófilos, e tem uma produção mais restrita, sendo altamente induzida e controlada por fatores de crescimento, quimiocinas e outros estimuladores. Já a MMP2 é expressa por vários tipos celulares, especialmente pelos fibroblastos e sua secreção é constitutiva, com modestos aumentos e diminuições sob diferentes condições (BJORKLUND e KOIVUNEN, 2005; LEE e MURPHY, 2004; LYNCH e MATRISIAN, 2002; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001; NAGASE e WOESSNER, 1999; RUNDHAUG, 2005).

O quinto principal subgrupo de MMPs é formado por MMPs tipo membrana (MT-MMPs). Estão ligadas à superfície celular através do domínio transmembrana C-terminal e degradam gelatina, fibronectina e agrecan, além de outros substratos da matriz extracelular. A MT1-MMP (MMP14), a MT2-MMP (MMP15) e a MT3-MMP (MMP16) ativam a MMP2 latente. Outras MMPs incluem: metaloelastase (MMP12) que promove proteólise e migração mediada por macrófago e, enamelisina (MMP20) envolvida na formação do esmalte dentário (LEE e MURPHY, 2004; RUNDHAUG, 2005; VIHINEN e KAHARI, 2002).

No intuito de evitar danos teciduais indesejáveis, é crucial um controle acurado da atividade de protease (BJORKLUND e KOIVUNEN, 2005). Esse controle acontece ao menos em três níveis: transcrição, ativação proteolítica, e inibição da atividade enzimática por inibidores naturais. A maioria das MMPs é expressa em baixos níveis ou não está expressa nos tecidos adultos, entretanto, várias citocinas e fatores de crescimento assim como interações celulares são fontes de estímulos que podem induzir expressão de MMP rapidamente (BJORKLUND e KOIVUNEN, 2005; OVERALL e LOPEZ-OTIN, 2002; REUNANEN et al., 2002; STAMENKOVIC, 2003). Ruptura da ligação cisteína-zinco por mecanismos físicos ou químicos é o primeiro passo na ativação dessas enzimas (RUNDHAUG, 2005).

Os maiores inibidores fisiológicos das MMPs são a α 2 macroglobulina, e a família das inibidoras teciduais de metaloproteinases, conhecidas como TIMPs (WOESSNER, 2001; 2002). Estas se ligam não covalentemente às MMPs ativas, inibindo sua atividade enzimática. As TIMPs possuem 12 resíduos pareados de cisteína que se ligam através de 6 pontes dissulfídicas, resultando

numa estrutura terciária altamente compacta. Há 4 tipos de TIMPS: a TIMP-1, a TIMP-2, a TIMP-3 e a TIMP-4 recentemente descoberta. As TIMPs são produzidas por uma variedade de tipos celulares tais como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e osteoblastos (WOESSNER, 2001; 2002).

As MMPs estão envolvidas em diversos processos, alguns fisiológicos como desenvolvimento, remodelação óssea, cicatrização, angiogênese, apoptose, e também patológicos, por exemplo, artrite, câncer, doença cardiovascular, úlcera gástrica, enfisema e outras (NAGASE e WOESSNER, 1999). Algumas de suas funções são: proteólise, criando espaço para migração celular, ou produzindo fragmentos que estimulam atividades biológicas; regulação da arquitetura celular através de efeitos na matriz e nas junções intercelulares; podem ativar, desativar ou modificar moléculas de sinalização, de maneira direta ou indireta; afetam as funções celulares regulando as proteínas de matriz com as quais as células interagem e mantêm a homeostase em resposta à desafios do meio ambiente, como reparação e infecção (PAGE-MCCAW et al., 2007).

Para a maioria das MMPS já foram descritos os substratos e as funções com as quais estão relacionadas, sendo algumas dessas funções específicas à determinada enzima. MMP13 é essencial na formação óssea do tipo endocondral, nesse processo o ponto crítico é a remodelação da matriz (STICKENS et al., 2004). Trabalho de Wiseman et al., 2003 mostrou que o desenvolvimento de glândulas mamárias depende de atividade de MMPs para que possa haver invasão e brotamento, nesse caso estão envolvidas as MMPs 2 e 3. MMP2 também promove crescimento de neuritos e pode desempenhar papel importante na regeneração de nervos periféricos (ZUO et al., 1998). Já na angiogênese, várias são as MMPs envolvidas: MMP2 e MMP9 ativam TGF β 1 e TGF β 2; MMP9 cliva a citocina pró-inflamatória e pró-angiogênica IL-8, essencial para o processo; MMPs 1, 3 e 7 liberam TNF α da superfície celular (RUNDHAUG, 2005).

Em relação à quebra de matriz extracelular e posterior disseminação tumoral, diversas são as matrixinas envolvidas no processo (MOSCATELLI e RIFKIN, 1988; WOESSNER, 1991). Contudo, em uma revisão, Chambers e Matrisian 1997, mostraram que evidências recentes vêm sugerindo um papel

51

mais complexo de MMPs nas etapas anteriores e após a degradação da matriz. Tanto as enzimas, quanto os seus inibidores se mostraram importantes reguladores de crescimento tumoral, atuando sobre os sítios primários e metastáticos das neoplasias. Os mecanismos parecem envolver regulação sobre o acesso aos fatores de crescimento provenientes da matriz extracelular, e que rodeiam o tumor. Além de manter um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral, as MMPs também promovem angiogênese. Dessa forma, estabelecem um microambiente que oferece suporte para o início e manutenção da doença.

Nesse contexto, entre as várias MMPs envolvidas na tumorigênese, as MMP2 e a MMP9 têm se destacado. Suas expressões aumentadas já foram observadas em várias neoplasias, como de mama, colo do útero, pulmão, pele, ovário e próstata (EGEBLAD e WERB, 2002). Esse aumento quase sempre vem acompanhado de atividades invasiva e metastática maiores, que levam a uma diminuição da sobrevida. Foi demonstrado que MMP9 libera fatores de crescimento, como VEGF e TGF-β promovendo dessa forma, angiogênese e crescimento do tumor (BERGERS et al., 2000; MIRA et al., 2004; RUNDHAUG, 2005). Ainda, atua liberando fragmentos protéicos, sítios crípticos e outros fatores com atividade quimiotática presentes na matriz extracelular, que por sua vez estimulam a migração. MMP2 e MMP9 foram relacionadas com espraiamento celular e mudanças no citoesqueleto durante a migração, além disso, o aumento na expressão dessas enzimas parece desestabilizar as adesões focais (BJORKLUND e KOIVUNEN, 2005).

Trabalhos do Laboratório corroboram com esses dados. Foi demonstrado que células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano, quando crescidas na presença de componentes da matriz extracelular, como laminina-111 e peptídeos derivados, tiveram aumento na secreção de MMP2 e MMP9 e esse aumento pode estar relacionado com atividade invasiva. Os trabalhos ainda mostraram o envolvimento de receptores do tipo integrinas na regulação dessa e de outras atividades biológicas (FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

2.5 Integrinas

As integrinas são uma grande família de receptores envolvida nas interações célula-célula e célula-matriz em diferentes processos, fisiológicos e patológicos. A maioria está presente em uma extensa variedade de células e, grande parte das células expressa diversas integrinas (DE MELKER e SONNENBERG, 1999; HYNES, 1987; 1992; MIRANTI e BRUGGE, 2002). As integrinas se tornaram as moléculas de adesão celulares mais estudadas e compreendidas desde o seu reconhecimento como receptores, o que ocorreu por volta de 1987 a partir de bloqueio da adesão celular com uso de anticorpos e também experimentos envolvendo cromatografia de afinidade (HYNES, 1987; 2002; MIRANTI e BRUGGE, 2002).

Diferem de receptores de superfície para hormônios, pois normalmente interagem com seus ligantes por meio de baixa afinidade e de modo geral, estão presentes em concentrações 10 a 100 vezes mais elevadas na superfície celular. Esta ligação simultânea, porém fraca, a várias moléculas de matriz permite que as células explorem o ambiente sem perder sua ligação à matriz. Se a ligação fosse muito forte, as células provavelmente iriam se tornar irreversivelmente ligadas, perdendo a capacidade migratória (ALBERTS et al., 2004; HYNES, 1987; 1992; 2002).

Integrinas são glicoproteínas heterodiméricas, formadas por duas subunidades chamadas de α e β que estão ligadas de maneira não covalente. As duas subunidades possuem juntas o peso molecular de 140 kDa e foram inicialmente isoladas através de colunas de afinidade contendo seqüências de aminoácidos (TAMKUN et al., 1986). Em mamíferos já foram identificados 18 genes codificantes da subunidade α e oito codificantes da β , o que daria uma possibilidade de mais de cem heterodímeros. Contudo a atual diversidade é bem mais restrita, tendo sido descritos apenas 24 tipos de integrinas (DE MELKER e SONNENBERG, 1999; HYNES, 1987; 1999; 2002). Isso acontece porque algumas subunidades α só se combinam com um único tipo de subunidade β , como visto em leucócitos. Nessas células há expressão tanto

de β 1 quanto de β 2, entretanto cada subunidade α consegue se associar a apenas um tipo de subunidade β (HYNES, 1992).

São receptores do tipo transmembrana, apresentam um domínio extracelular, um domínio citoplasmático e um segmento transmembrânico hidrofóbico (DE MELKER e SONNENBERG, 1999; HYNES, 1992; 2002). O nome integrina foi proposto justamente porque os autores consideram essa estrutura de membrana um complexo que integra, através de seus domínios transmembrânicos, a matriz extracelular e o citoesqueleto. O domínio extracelular é maior que o citoplasmático, podendo ter até 50 aminoácidos a mais. Dentre os domínios, o primeiro descrito foi o I/A localizado na subunidade α da porção extracelular, ele faz parte de um grupo de domínios envolvidos em interações proteína-proteína. Ainda, foi descrita a presença de um sítio para ligação a íons metálicos na região desse domínio (DE MELKER e SONNENBERG, 1999; HYNES, 1992; 2002).

Atualmente já está bem estabelecido que as integrinas são dependentes de cátions divalentes (como Ca²⁺ e Mg²⁺) para que possam estabelecer ligações com outras moléculas e, em algumas integrinas esses íons também participam da associação entre as subunidades α e β (DE MELKER e SONNENBERG, 1999; HYNES, 1992; 2002).

Um aspecto interessante desse domínio é que o mesmo pode se apresentar em duas conformações, "aberta" e "fechada". A conformação "aberta" apresenta alta afinidade/atividade, enquanto que a "fechada" possui baixa afinidade/atividade e, a alternância entre elas está relacionada com os ligantes ou estímulos que são capazes de ativar o receptor, como anticorpos e íons divalentes (HYNES, 2002).

Os domínios citoplasmáticos são os sítios que se ligam ao citoesqueleto e interagem com as vias de sinalização relacionadas as integrinas. Várias proteínas vêm sendo descritas como ligantes da cauda citoplasmática das integrinas, sendo que a maioria se liga à subunidade β (HYNES, 1992; 2002).

As caudas citoplasmáticas das duas subunidades desempenham papel importante na regulação do estado de ativação das integrinas, afetando a estrutura e a função de seus domínios extracelulares. Quando α e β se encontram associadas mantêm o receptor em seu estado inativo (HYNES, 2002). Estudo realizado por O'toole et al., 1994 testou se os domínios citoplasmáticos das integrinas estavam diretamente relacionados com as modulações de afinidade entre o receptor e o ligante. Os autores verificaram que as caudas citoplasmáticas transduzem sinais celulares que modulam a afinidade de ligação e, portanto, esses domínios podem ser alvos na modulação dessa afinidade. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que, mutações ou deleções nos sítios citoplasmáticos, podem produzir uma integrina constitutivamente ativada.

As mudanças conformacionais que ocorrem nas porções citoplasmáticas levam à ativação do domínio de ligação e posterior interação com o ligante na porção extracelular da integrina. Essas mudanças conformacionais provavelmente envolvem estiramento e separação. Essa é a sinalização conhecida como "de dentro para fora" (*inside-out signalling*), que envolve mecanismos de sinalização de dentro das células capazes de regular a atividade de ligação das integrinas na superfície celular (COPPOLINO e DEDHAR, 2000; HYNES, 2002).

Em contrapartida, ligação de moléculas à porção extracelular das integrinas aumenta a separação das caudas das subunidades citoplasmáticas, permitindo a interação com o citoesqueleto e também com moléculas sinalizadoras do citoplasma. Esse tipo de sinalização é chamado "de fora para dentro" (*outside-in signalling*), sendo essencial para a sobrevivência celular, tanto que na sua ausência as células podem entrar em apoptose (COPPOLINO e DEDHAR, 2000; HYNES, 2002).

Evidências do envolvimento de integrinas ativadas na geração de sinais bioquímicos intracelulares surgiram a partir de diversos trabalhos que monitoraram os eventos intracelulares quando os receptores eram estimulados. Integrinas podem causar: elevação do nível de cálcio intracelular; fosforilação de serina e tirosina de proteínas citoplasmáticas; acúmulo de GTP ligado a p21; ativação do sistema de transporte de membrana Na/H; alcalinização citoplasmática; mudanças no metabolismo fosfolipídico e; mudanças na expressão gênica (COPPOLINO e DEDHAR, 2000; RICHARDSON e PARSONS, 1995).

Além da ativação de integrinas por mudança conformacional, outro modelo descrito propõe a formação de um agregado ("clustering") desses receptores na superfície da membrana plasmática (HYNES, 2003).

A agregação leva a um aumento na força de interação na adesão celular, sem afetar a afinidade de ligação. Ou seja, embora a afinidade de ligação se mantenha a mesma, a avidez da adesão está aumentada devido a um número maior de moléculas envolvidas no processo. Existem evidências para os dois modelos. Como ativação conformacional e agregação lateral tipicamente ocorrem juntas, é possível que um evento leve ao outro. Entretanto, as opiniões ainda são divergentes sobre qual ocorre primeiro (HYNES, 2003).

A primeira evidência de que receptores de proteínas da matriz extracelular estão ligados ao citoesqueleto veio de observações a partir de trabalhos que analisaram a adesão de fibroblastos sobre substrato de fibronectina. As células apresentavam uma morfologia espraiada e achatada, com possível alongamento de processos celulares sugerindo uma reorganização do citoesqueleto (YAMADA e MIYAMOTO, 1995).

Outros achados que fortaleceram essa teoria mostraram: uma relação espacial entre fibronectina e α -actinina nos sítios de adesão de fibroblastos espraiados; fibrilas da matriz extracelular "presas" à membrana celular; codistribuição de actina e α -actinina, ou até mesmo vinculina no interior das células, com fibronectina fora das mesmas (CHEN e SINGER, 1982; DAMSKY et al., 1985).

Dentre as subunidades de integrina, a β 1 foi primeiramente mostrada em colocalização com fibronectina e diversos componentes do citoesqueleto, como actina, α -actinina, vinculina e talina. Posteriormente, foi observado que talina e α -actinina estão diretamente associadas com a cauda citoplasmática da integrina β 1. Esses achados confirmam, portanto, a ligação entre integrinas e filamentos de actina, e ainda identifica algumas das proteínas envolvidas nessa interação (CALDERWOOD et al., 1999; HYNES, 1992; MIRANTI e BRUGGE, 2002). Já ligações entre a porção citoplasmática da subunidade α e o citoesqueleto são menos evidentes (HYNES, 1992).

Integrinas não possuem atividade enzimática (GIANCOTTI e TARONE, 2003). Dessa forma, os mecanismos moleculares envolvidos na transmissão das mensagens entre as caudas citoplasmáticas e os mediadores intracelulares se tornaram alvos freqüentes de estudos. Isso conduziu a uma busca por proteínas "associadas às integrinas", que podem formar interações diretas com as mesmas ou então modular suas funções. Até o momento, vários candidatos com propriedades funcionais interessantes foram identificados, e incluem proteínas integrais de membrana e proteínas intracelulares.

Dentre essas proteínas, uma das primeiras a ser caracterizada como potencial proteína associada à integrina, foi a Quinase de Adesão Focal (FAK), uma tirosina quinase intimamente relacionada às estruturas de adesão focal. Foi demonstrado *in vitro* que FAK pode se ligar diretamente aos domínios citoplasmáticos das subunidades β 1, β 2 e β 3 (DEDHAR e HANNIGAN, 1996). "Clustering" de integrinas induz auto-fosofrilação de FAK na tirosina 397 e posterior ativação da tirosina quinase dessa proteína, servindo de gatilho para os mensageiros secundários intracelulares (RICHARDSON e PARSONS, 1995).

As integrinas também se associam a tetraspaninas, uma família de proteínas com quatro domínios transmembrânicos (TM-4). Essa ligação acontece principalmente com a subunidade $\beta 1$ ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$). Várias tetraspaninas incluindo CD9, CD63, CD81, CD82 e CD151 se colocalizam com $\alpha 3\beta 1$ na periferia das células (BERDITCHEVSKI, 2001). Outra classe de moléculas que estão relacionadas às integrinas é a família de proteoglicanos chamada sindecana, formada por quatro componentes. Embora não tenha sido descrita uma relação direta entre sindecanas e integrinas, já foi demonstrada, por exemplo, uma co-distribuição de sidencana-4 com as integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ em fibroblastos crescidos sobre fibronectina ou vitronectina, respectivamente (WOODS e COUCHMAN, 1994). Sindecanas são também capazes de influenciar funções nas quais as integrinas estão envolvidas, como adesão, migração e invasão (WOODS e COUCHMAN, 2000).

Deve ser ressaltado que as integrinas não são simples receptores de adesão, que funcionam exclusivamente como mediadores físicos de conexões

57

célula-matriz. Na verdade as integrinas estão envolvidas em complexas atividades celulares (COPPOLINO e DEDHAR, 2000). A maioria das interações adesivas das integrinas ocorre através de um peptídeo com seqüência RGD (PFAFF et al., 1994; TASHIRO et al., 1989). Essa seqüência está presente em mais de um tipo de componente da matriz extracelular. Isso demonstra o funcionamento das integrinas como receptor para várias moléculas, como a laminina (HUMPHRIES, 1996; HYNES, 1992).

Embora mais de 20 receptores tenham sido descritos para laminina-111, os mais conhecidos são as integrinas, enquanto que os demais receptores são chamados de não-integrinas (HYNES, 1992; 1999; 2002; MERCURIO, 1995). Integrinas desempenham importante papel mediando os efeitos profundos da laminina no comportamento celular, incluindo adesão, migração e diferenciação (MERCURIO, 1995; PATARROYO et al., 2002). São autênticos receptores que ao se ligarem a essa glicoproteína modulam as vias de sinalização intracelular em resposta à ligação. A lista de integrinas para a laminina é longa e as propriedades relacionadas à ligação e à significância biológica variam consideravelmente (MERCURIO, 1995).

Várias integrinas, incluindo $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$ e $\alpha 6\beta 4$, já foram descritas como receptores para a laminina. Essas interações podem ser específicas ou não. No último caso, uma mesma integrina pode se ligar a diferentes isoformas de laminina (PATARROYO et al., 2002). Uma hipótese para a abundância de lamininas e integrinas é que a diversidade de receptores contribui para a especificidade do grande número de fenômenos com os quais as lamininas estão envolvidas (MERCURIO, 1995).

Um dos mais importantes receptores funcionais para a laminina-111 parece ser a integrina $\alpha 6\beta 1$, devido a sua ampla expressão e envolvimento em vários fenômenos biológicos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (MERCURIO, 1995; PATARROYO et al., 2002). Estudo realizado por Friedrichs et al., 1995 mostrou que em 50% dos carcinomas invasivos de mama, a maioria das células expressavam a integrina $\alpha 6$ e que essa expressão estava correlacionada com a redução do tempo de sobrevida dos pacientes. Se por um lado certas integrinas já estão bem descritas, por outro lado, algumas, como $\alpha v\beta 3$, necessitam ainda de novos estudos para melhor compreensão de seu papel biológico.

As integrinas reconhecem principalmente as cadeias α da laminina e então determinam a adesão celular e as repostas às diferentes isoformas dessa molécula. Embora algumas funções possam ser comuns a todas as isoformas de laminina, outras funções podem ser únicas e específicas a uma determinada laminina, dependendo do tecido e também do órgão nos quais ela é mais expressa. Integrinas também reconhecem as cadeias β e γ das lamininas, porém essas interações são menos compreendidas (PATARROYO et al., 2002).

Uma forma encontrada pelos pesquisadores para organizar as lamininas e seus receptores foi identificar os domínios específicos dentro das subunidades de laminina com os quais as várias integrinas se ligam. A maioria das conclusões nessa direção vieram a partir de estudos sobre as ligações entre $\alpha 6\beta 1 e \alpha 1\beta 1$ com a laminina-111. Um padrão interessante que surgiu desses trabalhos é que os principais sítios de reconhecimento das integrinas estão localizados em pólos opostos da sua cruz. Um exemplo é o fato do sítio de ligação de $\alpha 6\beta 1$ estar localizado no domínio globular, na terminação carboxílica do braço longo da laminina (SONNENBERG et al., 1990). Já a integrina $\alpha 1\beta 1$ se liga à região do domínio IV, na terminação oposta, ou seja, região N-terminal da cruz (COLOGNATO-PYKE et al., 1995; PFAFF et al., 1994; SUNG et al., 1993).

As células podem expressar mais de um tipo funcional de integrina que se liga à laminina. Isso sugere que as integrinas podem estabelecer uma cooperação para promover reconhecimento específico das isoformas de laminina. Um exemplo são células que expressam tanto a integrina $\alpha 6\beta 4$ quanto a subunidade $\beta 1$ como ligantes de laminina. Essas possibilidades devem ser exploradas, pois tais células recebem estímulos e sinais de várias integrinas e essas informações aumentam a especificidade de ligação e subseqüentemente sinalizam de uma maneira sinérgica (MERCURIO, 1995).

3 PROPOSIÇÃO

Esse trabalho tem como objetivo analisar as atividades de migração, invasão e secreção de metaloproteases da matriz induzidas pelo peptídeo C16 em células CAC2. Adicionalmente estudamos os mecanismos regulatórios envolvidos nos efeitos do peptídeo. O estudo foi realizado nas seguintes etapas:

- Efeito do peptídeo bioativo C16 nas atividades de migração, invasão e secreção de MMPs pelas células do carcinoma adenóide cístico humano (CAC2).
- Possíveis vias de sinalização desencadeadas pelo peptídeo C16 em células CAC2. Essas vias estariam envolvidas nas atividades biológicas de migração, invasão e atividade de protease.
- Análise de integrinas como possíveis moléculas que traduziriam o sinal gerado pelo peptídeo C16 em células CAC2. Esse sinal estaria envolvido nas atividades biológicas de migração, invasão e atividade de protease.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Peptídeo utilizado

O peptídeo C16 foi obtido comercialmente da EZ Biolab (Westfield, IN, USA), posssuindo 98% de pureza por RP-HPLC e peso molecular confirmado por espectrometria de massa. Peptídeo "scrambled" C16SX foi obtido da empresa EZ Biolab, posssuindo 98% de pureza por RP-HPLC e peso molecular confirmado por espectrometria de massa.

4.2 Detecção da cadeia γ 1 da laminina *in vivo* e *in vitro* em carcinoma adenóide cístico

4.2.1 Imunohistoquímica

Cinco casos de carcinoma adenóide cístico foram resgatados a partir de amostras pertencentes ao arquivo do nosso laboratório. Os tecidos fixados em paraformaldeído 4% е incluídos em parafina foram estudados por imunohistoquímica. Secções de 3 µm foram obtidas e submetidas ao sistema de detecção polímero-HRP EnVision (EnVision; Dako Corp., Carpinteria, CA, USA). As secções montadas em lâminas cobertas com 3-aminopropiltrietoxi-silano (Sigma Chemical Corp, St Louis MO, USA) foram diafanizadas em xilol e hidratadas em gradiente de etanol (100%, 90% e 80%). A atividade da peroxidase endógena foi inibida por incubação das secções em 3% H₂O₂ em metanol por 20 min. Em seguida, os cortes foram bloqueados com solução de BSA 1% por 1 hora (BSA, Sigma) em Tris–HCI. Para que pudesse haver marcação da cadeia γ 1 da laminina, foi realizada recuperação antigênica tratando as secções com 1% de pepsina em 10 mM HCI por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. Em seguida, foi utilizado anticorpo monoclonal gerado em camundongo contra cadeia γ 1 da laminina (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), diluído 1/25 em PBS. Os cortes foram incubados com o anticorpo por um período de 1 hora. Diaminobenzidina (Sigma) foi

usada como cromogênio e as secções foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer (Sigma). Soro não específico serviu como controle negativo.

4.2.2 Cultura da linhagem celular CAC2

Células CAC2 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME,Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂. Toda a manipulação se deu em capela de fluxo-laminar. A análise clínica, morfológica e ultra-estrutural da neoplasia que deu origem à linhagem CAC2, bem como a caracterização da mesma, foi descrita em trabalhos anteriores (FRANCA et al., 2000; FRANCA et al., 2001; FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004). Esse trabalho não envolveu manipulação direta com seres humanos, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-ICB), parecer nº263, de 26 de agosto de 2008.

O crescimento das células foi monitorizado diariamente em microscópio invertido de contraste fase, e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a sub-confluência, as células foram sub-cultivadas. Amostras representativas da cultura foram posteriormente congeladas e mantidas em recipientes contendo nitrogênio líquido, crio-protegidas com 5-10% de di-metil sulfóxido (DMSO-Sigma).

4.2.3 Imunofluorescência

Células crescidas em lamínulas de vidro por um período de 24 horas e depois foram fixadas em paraformaldeído 1% em tampão fosfato salina (PBS) por 10 min. Seguiu-se lavagem em PBS e bloqueio com solução de BSA 1% por 1 hora. As células foram então submetidas a protocolo de imunofluorescência usando anticorpo monoclonal gerado em camundongo contra cadeia γ1 da laminina (Santa Cruz) diluído 1/100 em PBS. Esse anticorpo primário foi revelado por anticorpo secundário anti-camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa-568 (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA), diluído 1/100. Todas as incubações foram feitas por 1 hora à temperatura ambiente. O meio de montagem foi Prolong (Invitrogen). Soro não específico serviu como controle negativo.

Marcação para colágeno I foi realizada em células CAC2 plaqueadas sobre lamínulas de vidro cobertas ou com C16 ou com C16SX (100 μ g/ml). Células foram fixadas e permeabilizadas com solução 0,5% de Triton X-100 (Sigma) em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente em seguida foi realizada incubação com anticorpo policional de coelho para pró-colágeno I (Chemicon) diluídos em PBS na concentração final de 1:50. Anticorpo primário foi revelado por anticorpo secundário anti-coelho ao conjugado Alexa-568 (Invitrogen), diluído 1/100. Todas as incubações foram feitas por 1 hora à temperatura ambiente. Immunoblot avaliou diferenças na expressão do colágeno I em células CAC2 tratadas com C16 ou C16SX (100 μ g/ml).

4.3 Papel do peptídeo C16 regulando atividades de migração, invasão e secreção de proteases nas células CAC2

4.3.1 Ensaio de "ferida" em monocamada

As atividades de migração das células CAC2 foram investigadas através de ensaio de migração em monocamada *in vitro* já descrito na literatura (NOMIZU et al., 2000). Células foram crescidas em placas de 24 poços na presença de DMEM por 24 horas até alcançarem a confluência. Nesse momento, com auxílio de ponteira de pipeta gentilmente foi promovida uma descontinuidade na monocamada confluente, criando dessa forma uma área livre de células, ou seja, uma "ferida". Em seguida, as monocamadas com as "feridas" foram lavadas duas vezes com meio sem soro para remover debris celulares e na seqüência foram incubadas com DMEM sem soro contendo os peptídeos (50 µg/ml). Monocamadas em contato com peptídeo "scrambled" serviram como controles. Pontos de referência foram criados no fundo de cada poço da placa para localização dos campos correspondentes às "feridas" usando visualização microscópica direta e aquisição de imagens através de câmera acoplada ao microscópio. Esse procedimento permite fotografar a mesma região

nos intervalos de tempo. O fechamento da "ferida" foi acompanhado nos tempos de 0, 24 e 36 horas. Para determinar a taxa de migração celular nesse ensaio, a área inicial foi arbitráriamente marcada como 100% de área livre de células. O decréscimo percentual da área da "ferida" nos intervalos de tempo caracterizou o índice de migração celular. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2 Ensaio de migração em câmaras bipartites do tipo Transwell

Ensaios de migração também foram realizados em câmaras bipartites do tipo Transwell, utilizando filtros com poros de 8 µm em placas de 6 poços (BD Biosciences San Jose, CA, USA). Após tripsinizar as células, as mesmas foram transferidas para um tubo de ensaio na presença de DMEM. As células foram contadas e um total de 2 x 10⁵ células/ml foram colocadas em cada porção superior da câmara sobre a membrana porosa (8 µm). A placa multipoço foi coberta e incubada por 4 horas a 37°C em estufa de CO₂ para que ocorresse a adesão inicial das células. Em seguida o peptídeo foi colocado na câmara inferior diluídos em meio sem soro em uma concentração de 100 µg/ml. Amostras com a câmara inferior preenchida com peptídeo "scrambled" (100 µg/ml) serviram como controles. A placa foi incubada por 24 horas. Quando ocorre migração, as células atravessam a membrana e ficam localizadas na sua face inferior. Após o período de incubação, a câmara superior de migração foi delicadamente invertida, para remoção do conteúdo (células que não migraram e meio de cultura) da câmara superior. Nessa situação restaram somente as células que migraram localizadas na face inferior da membrana. Essas células foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, coradas com solução de Cristal Violeta 2% em metanol e imagens de sete campos de cada membrana foram adquiridas em aumento final de 500x para determinação do número de células que migraram através de contagem. Cada experimento foi realizado em triplicata.

4.3.3 Vídeo microscopia ("Time-Lapse")

Células CAC2 foram removidas dos frascos e plaqueadas por um período de 16 horas em placas de 60 mm. Em seguida, as células foram lavadas com solução de PBS 1x e meio L-15 (Meio Leibovitz, Sigma) foi acrescentado. As células foram tratadas com C16 (100 µg/ml) diluído no meio. Células controle foram crescidas em C16SX (100 µg/ml) diluído no meio. A migração celular foi investigada através de vídeo microscopia ("time-lapse") usando computador e estação de trabalho formada por microscópio Axiomat (Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) equipado com contraste de fase e Nomarski (contraste de interferência diferencial, DIC). Para a gravação do vídeo foi utilizada câmera digital Axiocam HRc (Carl Zeiss) conectada a computador, com o software de aquisição de imagens Axiovision 4.6 (Carl Zeiss). Durante todo o tempo experimental células controle e tratadas foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂ (câmara ambiental "Cell Observer", Carl Zeiss). Imagens em contraste de fase ou DIC foram adquiridas a cada 5 minutos em um tempo total de 8 horas. Para determinação da motilidade, marcações manuais dos centros dos núcleos celulares foram realizadas. O caminho de uma célula individual foi definido como a sequência de pontos do centro do núcleo em diferentes tempos. Mensurações do trajeto de células individuais em diferentes intervalos de tempo foram analizadas utlizando o plug-in MTrackJ (desenvolvido por Erik Meijering, Biomedical Imaging Group Rotterdam, Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, the Netherlands). Esse plug-in é um módulo do programa Image J (software de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA, HTTP://rsbweb.nih.gov/ij/), e foi desenvolvido para facilitar o desenho manual dos trajetos de objetos em movimento em imagens seqüenciais, como também permitir mensurações das distâncias percorridas e as velocidades. Obtivemos a distância percorrida em micrometros e a velocidade (µm/hora) de células CAC2 tratadas e controles.

4.3.4 Ensaio de invasão em câmaras bipartites do tipo Transwell

Para o ensaio de invasão utilizamos o mesmo sistema de câmaras bipartites do tipo Transwell, contudo, a membrana de policarbonato com poros de 8 µm de diâmetro da câmara superior foi coberta por 50 µl de Matrigel em uma concentração de 13 mg/ml. Células CAC2 foram tripsinizadas de seus respectivos frascos de cultura e ressuspendidas em número de 3 x 10⁵ células/ml DMEM sem soro para cada poço. Essas células foram colocadas na câmara superior de migração. Dessa forma, tinhamos células sobre a membrana porosa coberta por Matrigel. O peptídeo foi colocado na câmara inferior, diluídos em DMEM sem soro em um volume de 1,5ml em concentrações crescentes (25, 100, 250 e 500 µg/ml). Para controlar esse experimento, a câmara inferior foi preenchida com DMEM sem soro contendo peptídeo "scrambled" nas mesmas concentrações. A placa multipoço foi coberta e incubada por 48 horas a 37 °C na estufa de CO₂ para que ocorrasse a digestão do Matrigel e invasão das células da câmara superior para inferior. Após o período de incubação, a câmara superior de invasão foi delicadamente invertida, para remoção do conteúdo (células que não invadiram e meio de cultura) da câmara superior. Nessa situação restaram somente as células que digeriram o Matrigel e migraram, ficando localizadas na face inferior da membrana. Essas células foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, coradas com solução de Cristal Violeta 2% em metanol e imagens de sete campos de cada membrana foram adquiridas em aumento final de 500x para determinação do número de células que invadiram através de contagem. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Em paralelo, meio condicionado dos ensaios de invasão foram estudados através de zimografia.

4.3.5 Zimografia

O estudo da secreção das MMPs 2 e 9 para o meio condicionado foi realizado através de técnica de zimografia. Meio condicionado dos ensaios de invasão foram coletados e coquetel de inibidores de protease (contendo AEBSF, pepstatina, E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina, Sigma) foi adicionado. Em seguida as amostras

foram centrifugadas a 10.000g por 10 min. a 4 °C. O sobrenadante foi concentrado 20x e dialisado em PBS (Microcom 30.000D Millipore Inc Bedford MA). Essa etapa foi seguida pela adição de tampão de amostra sem agente redutor, contendo 2 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60 mM Tris pH 6.8, 30 % de glicerol e 0,01 % de azul de bromofenol.

Depois de normalizadas, as amostras foram carregadas em gel de 10 % de poliacrilamida contendo 0.2 % de gelatina. Foram carregados nos géis padrões de pesos moleculares e padrões de MMPs (Chemicon Co, Temecula, CA, USA). Após a eletroforese, o gel foi lavado em 10 mM de Tris (pH 8,0) incluindo 2,5 % de Triton X-100, para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, foi incubado por 15 minutos em solução tampão revelador do gel (50 mM de Tris, pH 8,8, 150 mM de NaCl, 5 mM CaCl₂) contendo 2 ml da solução de 2,5 % de Triton X-100, em temperatura ambiente e posteriormente por 20 horas à 37 °C na mesma solução. Depois de corar com Coomassie Brilliant Blue R-250 "overnight" e descorar com 40 % de metanol e 10 % de ácido acético glacial em água destilada, as metaloproteases ativas foram identificadas como bandas claras de lise em fundo azul.

Nas amostras controles e tratadas, as bandas de degradação enzimática obtidas na zimografia foram comparadas por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público *Image J*, criado por Wayne Rasband do National Institute of Mental Health, NIH, USA. Cada experimento de zimografia foi realizado em triplicata e repetido pelo menos duas vezes. Os dados densitométricos foram expressos como media±erro da média.

Realizamos controles negativos para confirmar se as bandas de lise eram resultado da ação das metaloproteinases da matriz. Para tanto dois outros géis, contendo as mesmas amostras descritas anteriormente, foram tratados com 5 mM de 1,10 fenantrolina (quelante de metais pesados) ou com 10 mM de EDTA (quelante de cálcio). Esses reagentes foram adicionados ao tampão de revelação. Os quelantes inibem a ação das MMPs e, conseqüentemente, bloqueiam a formação das bandas claras de lise já descritas.

4.4 Vias de sinalização celulares relacionadas às atividades migratória e/ou invasiva induzida pelo peptídeo C16 nas células CAC2

As vias de sinalização celulares relacionadas às atividades migratória e/ou invasiva induzidas pelos peptídeos foram estudadas de duas maneiras. Em uma etapa inicial células CAC2 foram submetidas a ensaio de "ferida" em placas de 6 poços. As células foram tripsinizadas de seus frascos e plaqueadas em placa de 6 poços por 24 horas. Depois de alcançada a confluência, DMEM com soro foi substituído por DMEM sem soro por um período de 4 horas. O objetivo dessa etapa foi eliminar os efeitos dos fatores de crescimento existentes no soro. Após esse tempo, seis "feridas" foram realizadas gentilmente com auxílio de ponteira de pipeta, promovendo áreas de descontinuidade da monocamada de células. Essas áreas livres de células que foram criadas funcionam como gatilho para as vias de sinalização relacionadas à migração celular, conforme descrito por Trinh et al. (2007). Nesse momento, os poços foram lavados com DMEM para remoção dos "debris" celulares. As células foram incubadas em DMEM sem soro acrescido dos peptídeos (100 µg/ml). Como controle negativo foi usado DMEM sem soro e como controle positivo DMEM sem soro acrescido de EGF (25 ng/ml). EGF é capaz de ativar vias de sinalização envolvidas na motilidade e secreção de MMP, como as vias AKT e ERK (ELLERBROEK et al., 2001). As células permaneceram nessas condições por 36 horas (mesmo intervalo de tempo utilizado nos ensaios de ferida). Na seqüência, as células foram lisadas em tampão de RIPA (150 mM NaCl, 1.0 % NP-40, 0.5 % deoxicolato, 0.1 % SDS, 50 mM Tris pH 8.0) com coquetel de inibidores de protease (Sigma). As amostras foram então submetidas a protocolo de "immunoblot" para análise de diferentes vias de sinalização (FAK, AKT, e ERK) valendo-se de anticorpos tanto contra a forma fosforilada das proteínas como para a forma não fosforilada. O protocolo de "immunoblot" está descrito a seguir.

Amostras, depois de quantificadas, foram ressuspendidas em tampão de amostra contendo 3 % de SDS, 15 mM de tris (pH 6,8), 15 % de β -mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01 % de azul de bromofenol. As amostras em igual quantidade protéica (20 µg), foram carregadas em gel de gradiente de 4-12 % de poliacrilamida (Novex-Invitrogen). Após a eletroforese, as bandas protéicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham). As membranas foram bloqueadas

com 5 % de BSA em TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100 mM de NaCl, 0.1 % de Tween 20), e incubadas com anticorpo primário contra a forma fosforilada da proteína alvo da via (fosfo-ERK, fosfo-FAK, fosfo-AKT, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) diluídos em TBS 1/500. Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1/5000). Protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham) foi utilizado para revelar a reação. Para garantir que a mesma quantidade de proteína foi carregada nos géis, as membranas foram "stripped" e remarcadas para as formas não fosforiladas das proteínas alvo. A única modificação feita diz respeito ao bloqueio da membrana, que foi realizado com 1 % de BSA, 10 mM de NaF, 10 mM de Na₃VO₄ em TBS. As amostras foram centrifugadas (10,000g) por 10 min a 4 °C, os sobrenadantes foram recolhidos e quantificados (BCA kit, Pierce).

Em paralelo, complementando o estudo das vias, o meio condicionado das monocamadas submetidas ao ensaio de "ferida" foi recolhido, concentrado e as amostras carregadas em géis de 10 % de poliacrilamida contendo 0,2 % de gelatina (Novex-Invitrogen Co, USA) para análise da secreção de MMPs por zimografia, conforme descrito anteriormente.

4.5 Papel de ERK na sinalização de C16 nas células CAC2

Em uma segunda etapa de análise das vias de sinalização, tratamos as células com os inibidores para a via de ERK. A via de ERK foi analisada através do tratamento das células CAC2 com o inibidor específico UO126 (Cell Signalling Technology, Bervely, MA, USA). A concentração do reagente variou entre 10 e 50 μ M. Células CAC2 (10⁵) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino em placa de 6 poços até a adesão das células. O meio foi removido e as células lavadas 3 vezes com PBS. Meio de cultura foi adicionado e dessa forma, as células foram privadas de soro por 24 horas. Ao fim dessa etapa, novo meio sem soro foi adicionado com diferentes concentrações de inibidor. Após duas horas de tratamento com o inibidor, os peptídeos C16 ou C16SX ("scrambled") foram adicionados e a concentração final de cada um deles foi de 100 µg/ml. Após 24 horas, o meio condicionado foi removido, concentrado/dializado e analisado por

zimografia. Para analisarmos se a inibição por UO126 foi específica realizamos "immunoblot" visando detectar ERK total e fosfo-ERK. As células CAC2 tratadas por C16 e controles (em contato com C16SX) foram lisadas com tampão RIPA cotendo inibidores de proteases e fosfatases. O protocolo de "immunoblot" utilizado foi descrito anteriormente. Os anticorpos contra ERK e fosfo-ERK foram obtidos da Santa Cruz.

4.6 Isolamento e purificação de receptores das células CAC2 a partir de colunas de afinidade contendo o peptídeo imobilizado

4.6.1 Escolha e preparo das colunas de afinidade

A imobilização de um peptídeo em uma coluna se estabelece através da ligação da resina (que forma a coluna) a grupos comuns, presentes tanto em proteínas como peptídeos, os grupos amino e carboxi. Essa imobilização deve ocorrer por apenas uma extremidade do peptídeo, já que ele deve ficar disponível para o seu ligante na coluna. Dessa forma a eficiência da coluna de afinidade pode ficar comprometida se o peptídeo se dobrar sobre si mesmo, ou ligar-se paralelamente a resina. O isolamento e purificação de receptores foram realizados com colunas contendo o peptídeo C16 imoblizado.

Grande parte das resinas obtidas comercialmente são as do tipo que se ligam ao grupo amina. Realizamos imobilização do peptídeo C16 (KAFDITYVRLKF) em resina que se ligue ao grupo amina (resina Affi-Gel 10, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Um volume de 4ml da resina Affi-gel contendo as esferas foi colocado em uma coluna e lavado com o tampão de conjugação (0,1M de NaHCO₃ pH 8,5). Foram diluídos 2 mg/ml de peptídeo em tampão de conjugação que foram adicionados a coluna e incubados "overnight" a 4 °C em agitação. Depois. os grupamentos ativos remanescentes foram bloqueados com 0,1 M de dietanolamina por 1 hora, em seguida a coluna foi lavada com 1 M NaCl e através da análise do conteúdo da lavagem, foi possível saber se houve ligação do peptídeo à resina. Além do peptídeo, foi confeccionada coluna controle com peptídeo scrambled (C16SX).

4.6.2 Obtenção das frações enriquecidas com membrana

As frações de membranas das células CAC2 foram obtidas através de células crescidas em placas de 150 mm (Corning). As células foram lisadas e a fração enriquecida com membrana foi obtida através do kit "Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extract Reagent" (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante. Esse kit utiliza um detergente fraco, não denaturante, que proporciona a obtenção de proteínas de membrana funcionais. As amostras tratadas com o detergente foram incubadas a 37° C por 20 minutos para que ocorresse a separação da porção hidrofóbica da hidrofílica, através de partição de fase. A maioria das proteínas de membrana que representavam as proteínas de interesse, estavam presentes na fração hidrofóbica obtida. A remoção do detergente do kit foi alcançada através de diálise realizada "overnight" a 4 °C em tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 1 % Triton X-100 e 5 % de glicerol).

4.6.3 Eluição

Com as colunas prontas, aplicamos a preparação de membrana de células CAC2 e deixamos incubar 3 horas a 4 °C. Após incubar a preparação de membranas por 3 horas a 4 °C nas colunas de afinidade, foram realizadas extensivas lavagens feitas com o tampão de lavagem. A próxima etapa foi realizada com diferentes agentes de eluição e em ordem decrescente de especificidade. Para realizar a eluição dos putativos ligantes do peptídeo C16, iniciamos com soluções contendo quelantes de íons divalentes, essenciais ao funcionamento de diversas moléculas, incluindo integrinas. Foram utilizados 5 mM, 10 mM e 20 mM de EDTA. Para finalizar, utilizamos agente de eluição menos específico, 1M de NaCI. Os eluatos obtidos foram concentrados através de precipitação em etanol.

As amostras eluídas foram carregadas em gel de eletroforese para a separação de acordo com o peso molecular. Os geís obtidos foram corados com Coomassie Blue, as bandas visíveis foram recortadas do gel a transferidas para tubo de 0,5 ml tipo eppendorf, lavadas em água destilada e desidratadas em metanol. As etapas de preparação das amostras (digestão do gel), espectrometria de massa (LC-MS/MS) e "peptide fingerprint" foram realizadas como serviço prestado no Centro de Pesquisa Proteômica da Universidade Rockefeller (Nova York, NY, USA).

4.7 Interação de integrinas com células CAC2

4.7.1 Análise da expressão das integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$ através de imunofluorescência

Para realizar imunolocalização de integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$, células CAC2 foram plaqueadas em lamínulas de vidro (24 mm) por um período de 24 horas. Utilizamos protocolo descrito por Sonnenberg et al., 1990 para imunomarcação de integrinas. Após a fixação conforme descrito anteriormente, realizamos permeabilização em Triton X-100 (Sigma) 0,5 % em PBS por 5 min., seguida por bloqueio com 1 % de BSA em PBS durante 60 min. a temperatura ambiente. Os anticorpos diluídos 1/50 em PBS foram incubados por 60 min. a temperatura ambiente. Foram usados anticorpos anti-integrina αv (policional gerado em coelho, AB1930, Chemicon), anti-integrina $\alpha 5$ (policional gerado em coelho, AB1928, Chemicon), anti-integrina β 3 (policional gerado em coelho, AB1932, Chemicon), antiintegrina β 1 (policional gerado em coelho, AB1953, Chemicon). Os anticorpos primários foram revelados com secundário anti-coelho conjugado com Alexa-568 (Invitrogen). A montagem das lâminas foi realizada com ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA). Lâminas montadas foram examinadas em microscópio de fluorescência Axiophot, equipado com objetivas 63x PlanApo 1.4 NA (Carl Zeiss Oberkochen, Germany). As amostras foram adquiridas através de câmera monocromática CCD digital Quantix KAF1400 (Photometrics, Tucson, CA, USA). Essa câmera, resfriada por acessório "Peltier", possui alta sensibilidade e é específica para amostras fluorescentes. As imagens foram adquiridas e analisadas no software de domínio público Micro-Manager 1.2 (http://www.micro-manager.org/), desenvolvido por Nico Stuurman, Nenad Amodaj e
Ron Vale (UCSF, San Francisco, CA, USA).

4.7.2 "Immunoblot" para integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$ em preparações de membranas de células CAC2

Foi realizada análise da expressão das integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$ nas frações eluídas da coluna de afinidade do peptídeo C16. As amostras eluídas com as soluções de EDTA 5 mM, 10 mM, 20 mM e NaCl 1M conforme descrito anteriormente foram carregadas em gel de eletroforese para a separação de acordo com o peso molecular e em seguida foram submetidas a protocolo de "immunoblot". As membranas foram incubadas com anticorpos anti-integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$ (policonais gerados em coelho, Chemicon) diluídos 1:1000. Protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham) foi utilizado para revelar a reação.

4.7.3 RNA de interferência

Obtivemos comercialmente RNA de interferência (RNAi) para integrinas αv , α 5, β 3 e β 1 (Invitrogen), meio de transfecção (Optimen, Invitrogen) e reagente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen). Células CAC2 foram colhidas dos frascos e crescidas em placas de 6 poços a 50 % de confluência. Em seguida, de acordo com as instruções do fabricante, o meio de transfecção, o reagente de transfecção e o RNA de interferência foram combinados e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Essa solução foi adicionada às células CAC2 que permaneceram a 37 °C por 30 horas. Como controle, outro grupo de células CAC2 foi transfectado com RNA de sequencia "scrambled" (composição proprietária da Invitrogen), que não induz degradação de nenhuma mensagem celular. Decorrido esse tempo, células transfectadas com RNAi e controles foram colhidas das placas e submetidas aos seguintes experimentos: 1) "Immunoblot" para observarmos se o tratamento com RNAi diminuiu a expressão das integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$; 2) Ensaio de migração, para analisarmos se o tratamento com RNAi interferiu na atividade migratória induzida pelo peptídeo. Células silenciadas para as integrinas $\alpha v, \alpha 5, \beta 3 \in \beta 1$ foram crescidas na presença do C16 e C16SX, e 3) Zimografia, para analisarmos se o tratamento com RNAi interferiu na secreção de MMPs pelas células CAC2, nas mesmas condições descritas acima.

4.7.4 "Immunoblot"

As células transfectadas pelo RNAi foram lisadas em tampão RIPA contendo inibidores de protease (1 mg/ml pepstatina A, 100 mM PMSF e 1mg/ml E-64). Em seguida foram centrifugado a 10.000g por 10 min. a 4 °C. Seguiu-se quantificação de proteína através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA). As amostras foram ressuspendidas em tampão de amostra, contendo 3 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6.8, 15 % de mercaptoetanol, 30 % de glicerol e 0,01 % de azul de bromofenol.

Eletroforese foi realizada seguindo o método SDS-PAGE. Cada poço foi carregado com 30µg de proteína, que foram separadas em gel de poliacrilamida 10 % (preparado com 1.5M Tris-HCl, 10 % SDS, 30% bis-acrilamida, 10 % de persulfato de amonia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham). As membranas foram bloqueadas com 5 % de leite desnatado em 0,05 % de Tween-20 em TBS (TTBS), e incubados com anticorpos anti-integrinas αv (policional gerado em coelho, AB1930, Chemicon), antiintegrina $\alpha 5$ (policional gerado em coelho, AB1928, Chemicon), anti-integrina $\beta 3$ (policional gerado em coelho, AB1932, Chemicon), anti-integrina β1 (policional gerado em coelho, AB1953, Chemicon) ou β -actina (monoclonal de camundongo, Sigma,). Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Protocolo de quimoluminescência (ECL kit, Amersham) foi utilizado para revelar a reação em filmes radiográficos. Para possibilitar marcação com os diferentes anticorpos anti-integrinas, as membranas foram "stripped" com "Restore Western Blot Stripping Buffer" (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) e submetidas a novas marcações com anticorpos.

Nas amostras controles e tratadas pelo RNAi, a eficiência da transfecção foi analisada pela diminuição na expressão das integrinas, quando comparada ao controle interno de β-actina.

4.7.5 Ensaio de migração (células tratadas com RNAi)

Células CAC2 tiveram os seguintes receptores silenciados por RNAi: integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ e $\beta 1$. Foram constituídos grupos experimentais com silenciamento ou de αv , ou de $\alpha 5$, ou de $\beta 3$, ou de $\beta 1$ para os ensaios com o peptídeo C16 e com C16SX. Não houve transfecção de múltiplos RNAi. Como controle utilizamos RNAi de seqüência "scrambled", que não induz nenhuma degradação específica de nenhuma mensagem celular. O protocolo de transfecção foi o mesmo descrito anteriormente.

Ensaios de migração com células silenciadas para as integrinas foram realizados em câmaras bipartites do tipo Transwell, utilizando filtros com poros de 8 μ m em placas de 6 poços (BD Biosciences San Jose, CA, USA). Após o período de tratamento com RNAi as células foram tripsinizadas, contadas e submetidas a protocolo de migração conforme já descrito. Células com as integrinas αv , $\alpha 5$, $\beta 3$ ou $\beta 1$ silenciadas foram crescidas na presença do C16 (100 μ g/ml, em DMEM sem soro). Como controle, células CAC2 com integrinas silenciadas foram crescidas na presença de C16SX (100 μ g/ml). A placa foi incubada por 24 horas. Após o período de incubação, a câmara superior de migração foi delicadamente invertida, para remoção do conteúdo (células que não migraram e meio de cultura) da câmara superior. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4 % em PBS, coradas com solução de Cristal Violeta 2 % em metanol. Imagens de sete campos de cada membrana foram adquiridas em aumento final de 500x para determinação do número de células que migraram através de contagem. Cada experimento foi realizado em triplicata.

4.7.6 Integrinas regulando a atividade de protease induzida por C16 nas células CAC2

O ensaio de migração descrito anteriormente foi realizado durante 24 horas em meio DMEM sem soro. Em 24, células CAC2 crescidas em DMEM sem soro secretam, proteínas para o meio condicionado. Dessa forma, células controle e com integrinas silenciadas por RNAi tiveram os meios condicionados dos ensaios de migração coletados, dialisados, concentrados e analisados por zimografia para MMPs. Depois de normalizadas, as amostras foram carregadas em gel de 10 % de poliacrilamida contendo 0.2 % de gelatina. O protocolo utilizado na realização da zimografia de células tratadas com o RNA de interferência foi o mesmo descrito anteriormente. Esses experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes. Células CAC2 com receptores silenciados por RNAi e células controles (RNAi de seqüência "scrambled") foram crescidas em contato com o peptídeo C16, diluído em DMEM sem soro, na concentração de 100 μg/ml. Como controle células com receptores silenciados por RNAi de seqüência "scrambled") foram crescidas em controles (RNAi de seqüência "scrambled") foram concentração de 100 μg/ml. Como controle células com receptores silenciados por RNAi e células controles celulas com receptores silenciados por RNAi e células controles (RNAi de seqüência "scrambled") foram concentração de 100 μg/ml. Como controle células com receptores silenciados por RNAi e células controles (RNAi de seqüência "scrambled") foram concentração de 100 μg/ml. Como controle células com receptores silenciados por RNAi e células controles (RNAi de seqüência "scrambled") foram crescidas em contato com o peptídeo C16SX (100 μg/ml).

4.8 Análise estatística

A análise estatística de experimentos com mais de dois grupos foi feita pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Nos experimentos com dois grupos utilizamos o teste *t* de Student. O software utilizado foi o Graph Pad Prism, versão 4 para Macintosh (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Presença da cadeia γ1 da laminina *in vivo* e *in vitro*

A cadeia γ 1 da laminina, que contém o peptídeo C16, foi detectada no carcinoma adenóide cístico *in vivo* (Fig. 1A). Essa proteína foi observada como uma estrutrua linear semelhante à membrana basal nas áreas cribriformes do tumor (Fig. 1A, setas). Áreas de fragmentação da membrana basal também foram observadas (Fig. 1A, cabeça de seta). Linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico (CAC2) expressou a cadeia γ 1 da laminina. A proteína foi observada como pontos distribuídos ao longo da membrana celular (Fig. 1B). A marcação para laminina representa distribuição da proteína na membrana celular, uma vez que as amostras não foram permeabilizadas.

5.2 O peptídeo C16 regula atividade de migração na célula CAC2

Os ensaios para análise da atividade migratória mostraram que C16 induziu aumento da migração em células CAC2. Ensaio de "ferida" mostrou que células crescidas na presença de peptídeo tiveram sua atividade migratória aumentada quando comparadas às células controles, crescidas na presença de peptídeos "scrambled" (Fig. 2). Após 24 horas, células tratadas por C16 mostravam que a área livre de células havia diminuído para 25 %. Já as células tratadas com o peptídeo "scrambled", C16SX, exibiram 80 % de área livre de células. Após 36 horas de tratamento com C16, apenas 15 % da área da "ferida" permaneceu livre de células, por outro lado, pelo menos 75 % da "ferida" ainda estavam livres de células na amostra tratada com C16SX (Fig. 2, gráfico). Esses resultados mostraram que o peptídeo C16 induziu 3.5x aumento da migração de células CAC2. Esses experimentos foram realizados pelo menos três vezes, com resultados semelhantes. Os ensaios de migração com células CAC2 realizados em câmaras bipartites confirmaram os resultados obtidos nos ensaios de "ferida". Células tratadas com o peptídeo C16 tiveram aumento na migração de 3.5x guando comparadas às células controles, crescidas na presença do peptídeo "scrambled" (Fig. 3A). As imagens adquiridas em time-lapse mostraram que C16 aumentou a velocidade das células CAC2 quando comparadas às células controle. A Figura 3B representa as trajetórias celulares obtidas em amostras tratadas (C16) e controle (C16SX). Células tratadas apresentaram trajetórias maiores durante o tempo e esse aumento foi significativo (Fig. 3B, gráfico). Células controle se moveram com velocidade de $3.25 \,\mu$ m/h, enquanto que as células tratadas com C16 se moveram a 7.09 μ m/h (Fig. 3B, gráfico).

5.3 O peptídeo C16 regula atividade de invasão e de secreção de MMPs em células CAC2

Ensaio de invasão realizado em câmaras bipartites do tipo Transwell com a membrana coberta por Matrigel mostrou que o peptídeo C16 foi capaz de estimular atividade invasiva de células CAC2, comparadas aos controles (Fig. 4A). Esse aumento foi dose dependente. Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes, com resultados semelhantes.

Invasão depende de atividade de protease (BUCCIONE et al., 2004; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; PAGE-MCCAW et al., 2007; STAMENKOVIC, 2003). Para analisar se a atividade invasiva induzida pelos peptídeos nas células CAC2 estaria relacionada com proteases, meio condicionado do ensaio de invasão foi coletado e submetido à zimografia. Células CAC2 crescidas na presença de C16 mostraram bandas genatinolíticas com pesos moleculares correspondentes às MMPs 2 e 9. Controles positivos para MMP2 e MMP9 corridos no mesmo gel confirmaram esses resultados (Fig. 4B, gel). Os resultados mostram que houve um aumento dosedependente na secreção de MMP9 pelas células crescidas na presença de peptídeos, quando comparadas às células controle (Fig. 4B, gráfico esquerdo).

Obtivemos com o ensaio zimográfico a resolução tanto das bandas latente quanto ativa de MMP9 e MMP2. É possível verificar que o aumento da MMP9 ocorreu de acordo com a dose de C16 (Fig. 4B, gráfico esquerdo). Células crescidas na presença de C16SX também produziram MMPs. Para determinar se essas bandas seriam provenientes de atividade de metaloproteinases, amostras controles correram paralelamente e foram tratadas com quelante de cálcio (EDTA) e quelante de metais pesados (1,10 fenantrolina). Os dois tratamentos resultaram na perda da atividade de gelatinase demonstrando que as bandas gelatinolíticas eram MMPs (Fig. 4B, gel). A densitometria das bandas gelatinolíticas feita através do Software de domínio público Image J, mostrou que C16 induz aumento dose-dependente de MMP9 quando comparado ao controle (Fig. 4B, gráfico esquerdo).

O peptídeo C16 induziu migração, invasão e secreção de proteases em células CAC2. A seguir, analisamos os mecanismos regulatórios envolvidos nessas atividades biológicas induzidas pelo peptídeo em células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano.

5.4 As vias de sinalização AKT e ERK estão "downstream" a C16 na regulação de migração e secreção de MMPs nas células CAC2

Diferentes vias de sinalização, que podem estar envolvidas em migração, invasão e atividade de protease induzidas por C16, foram analisadas. Células CAC2 foram submetidas a ensaio de "ferida" em monocamada seguido de tratamento com C16 (100 µg/ml). Amostras com DMEM serviram como controle negativo e DMEM com EGF (25 ng/ml) serviram como controle positivo. Análise de fosfo-AKT e fosfo-ERK através de "immunoblot" mostrou que células CAC2 tratadas com os peptídeos tiveram um aumento na fosforilação quando comparadas aos controles. Não houve diferença na expressão de fosfo-FAK entre os tratados e controles (Fig. 5A, "immunoblot"). Em paralelo, foi analisada a atividade de protease das células CAC2 submetidas ao ensaio de "ferida" e tratamento com peptídeos. Células crescidas na presença de C16 tiveram a secreção de MMP2 e 9 aumentada em comparação aos controles (Fig. 5A, zimografia). Esses resultados sugerem que as vias de AKT e ERK podem estar envolvidas nos efeitos de C16 em células CAC2.

5.5 UO126 inibe a produção de MMPs induzidas por C16

O inibidor específico para MEK, UO126, foi utilizado para analisar o papel da sinalização de ERK durante a indução/ativação da atividade de protease induzida por C16 nas células CAC2. Diminuição dose-dependente da atividade de MMPs foi observada nas células CAC2 tratadas por UO126 (Fig. 5B, superior esquerdo). Como controle analisamos por zimografia o meio condicionado de células incubadas com UO126 seguida de tratamento pelo peptídeo C16SX. Nessa condição experimental não foram verificadas alterações na secreção de MMPs em células CAC2 (Fig. 5B, inferior esquerdo). "Immunoblot" para fosfo-ERK, mostrou que o efeito induzido por UO126 nas células CAC2 foi específico (Fig. 5B, direito).

5.6 Cromatografia de afinidade e espectrometria de massa sugerem que integrinas e colágeno I formam um complexo com C16 em células CAC2

Frações de membrana obtidas de células CAC2 foram submetidas à cromatografia de afinidade em colunas que continham o peptídeo C16 imobilizado. Os possíveis ligantes foram eluídos com quelantes de cátions divalentes e tampões com alta molaridade ou pH ácido. As amostras eluídas foram carregadas em gel de eletroforese para a separação de acordo com o peso molecular. Os geís obtidos foram corados com Coomassie Blue que revelou uma banda de 40kDa eluída com solução de EDTA 10 mM da coluna de afinidade de C16 (Fig. 6A, painel esquerdo). Essa banda foi analisada por espectrometria de massa (LC-MS/MS) e foram obtidos mapas peptídicos ("peptide fingerprints"), posteriormente comparados com bancos de dados de proteínas (EMBL Protein and Peptide Search: MascotSearch; Pepfrag; Protein Prospector). A cadeia $\alpha 1$ do colágeno foi identificada (Fig. 6A, painel direito). Esse resultado foi confirmado em outras amostras. Estudos que analisam a quebra e degradação do colágeno revelaram bandas de diferentes pesos moleculares, entre 250-37kDa (MADSEN et al., 2007; NYBERG et al., 2003). Imunofluorescência mostrou que as células CAC2 expressam colágeno tipo I (Fig. 6B). Adicionalmente, C16 aumenta a expressão dessa proteína nas células CAC2 quando comparado ao controle. conforme mostram OS resultados de imunofluorescência e "immunoblot" (Fig. 6B). C16 induziu uma expressão maior dos fragmentos 1/4 do colágeno I, provavelmente o mesmo fragmento caracterizado pela espectrometria de massa e "peptide fingerprint"

Tem sido sugerido que C16 interagiria com colágeno I e fibronectina através das integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, respectivamente (PONCE et al., 2001). Diante disso,

decidimos estudar se essas integrinas poderiam estar formando um complexo com colágeno I e C16 nas células CAC2. Primeiramente foram pesquisadas as expressões de $\alpha\nu\beta3$ e $\alpha5\beta1$ nessas células. Imunofluorescência mostrou que as subunidades de integrinas $\alpha\nu$, $\beta3$, $\alpha5$ e $\beta1$ são expressas nas células CAC2 (Fig. 7A). Para verificar se essas integrinas fariam parte de um complexo colágeno I-C16, frações eluídas com soluções de EDTA (5 mM, 10 mM e 20 m) e NaCl 1 M foram carregadas em gel de eletroforese e depois trasnferidas para membranas de nitrocelulose que foram imunomarcadas com anticorpos para integrinas $\alpha\nu$, $\alpha5$ e $\beta1$ foram observadas tanto na fração de membrana quanto nos eluatos (Fig. 7B). Não foi observada reatividade nos eluatos para integrina $\beta3$ (dado não mostrado). Analisando os dados obtidos tanto na cromatografia de afinidade como na espectrometria de massa, pode-se sugerir que integrinas e colágeno I formam um complexo com C16 em células CAC2.

5.7 Integrinas sinalizam "downstream" de C16 e regulam migração e secreção de MMPs em células CAC2

RNA de interferência (RNAi) forneceu mais evidências sugerindo que os efeitos biológicos de C16 seriam mediados por integrinas nas células CAC2. Inicialmente confirmamos a eficiência de transfecção do RNAi por "immunoblot".

Para os ensaios realizados com C16, células CAC2 foram transfectadas com RNAi para as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5 e \beta 1$. Tem sido sugerido que o peptídeo C16 interagiria tanto com colágeno I quanto com fibronectina. Essa interação estaria acontecendo através da integrina $\alpha v\beta 3$, ligante de colágeno I e da integrina $\alpha 5\beta 1$, ligante de fibronectina (PONCE et al., 2001). Células silenciadas com RNAi foram submetidas a ensaio de migração em câmara bipartite na presença de C16 por um período de 24 horas. Células nas mesmas condições foram crescidas na presença de C16SX e serviram como controle. O silenciamento das integrinas promoveu diminuição significativa na atividade migratória dessas células, quando comparadas às amostras controle, transfectadas com RNAi "scrambled" e crescidas na presença de C16 (Fig. 8A, lado esquerdo do gráfico). Adicionalmente, zimografia do meio condicionado mostrou que células CAC2 com reduzida expressão de integrinas exibiram diminuição da secreção de MMPs induzida por C16 (Fig. 8B, gel a esquerda). Nenhuma diferença na migração e na atividade de protease foi encontrada nas células CAC2 com integrinas silenciadas e tratadas com o petídeo controle C16SX (Fig. 8A e B, lado direito do gráfico e gel à direita). A eficácia de transfecção foi confirmada por "immunoblot" (Fig. 8C).



Fig. 1

Fig. 1: Cadeia γ1 da laminina-111 é detectada no carcinoma adenóide cístico *in vivo* (A) e *in vitro* (B). Essa proteína pode ser observada como estrutura linear semelhante à membrana basal nas áreas cribriformes do tumor (A, setas). Áreas de fragmentação da membrana basal também são observadas (A, cabeça de seta). Linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico (CAC2) expressa a cadeia γ1 da laminina. Essa proteína é observada como pontos distribuídos sobre a membrana celular (B). Escala: 10 μm.



Fig. 2

Fig. 2: Ensaio de "ferida" mostra que C16 aumenta migração de células CAC2. Microscopia de contraste de fase e medidas das áreas mostram o espaço da "ferida" das monocamadas. Células tratadas com C16 estão próximas do fechamento após período de 36 horas quando comparadas às células crescidas na presença de C16SX. Esses resultados mostram que o aumento é de 3.5x na atividade de migração de células CAC2 (gráfico). Asterisco indica dados significantes comparados ao controle (P<0.05). Resultados representam média ± de erro da média de três experimentos realizados pelo menos três vezes. Escala: 50 μm.

A) Ensaio de migração em "Transwell"



B) Microscopia de "Time-Lapse"



Fig. 3

Fig. 3: Ensaio de migração em câmara do tipo Transwell mostra que a taxa de migração de células CAC2 tratadas com C16 é 3.5x maior que as células controle (A). "Time-lapse" (B) confirma resultado obtido com os ensaios de "ferida" e de Transwell. Imagens em DIC com as trajetórias de células CAC2 superpostas (trajetórias pretas) ilustram marcação manual da mesma célula em diferentes intervalos de tempo. Células tratadas (C16, N=30) apresentam trajetórias (em branco) maiores pelo tempo quando comparadas às células controle (C16SX, N=30). Aumento na migração induzida por C16 é significativo (B, gráfico). Velocidade das células controle é 3.25 μm/h, enquanto que das células tratadas com C16 é 7.09 μm/h. Asteriscos indicam dados significantes comparados aos controles (P<0.05). Resultados representam média ± de erro da média de três experimentos realizados pelo menos três vezes. Escala: 50 μm.





Fig. 4: C16 regula invasão (A) e atividade de protease (B) em células CAC2. Ensaio de invasão foi realizado em câmaras do tipo Transwell cobertas com Matrigel. A taxa de invasão de células CAC2 tratadas com C16 é dose-dependente e significativamente maior que as células controle (A). Meio condicionado do ensaio de invasão (conforme descrito em material e métodos) foi analisado por zimografia (B), mostrando bandas correspondentes às formas latente e ativa das MMPs 2 e 9 (B, painel superior). Controle positivo de MMPs 2 e 9 (Std MMP) estão incluídas, e tratamentos com 1,10 fenantrolina e EDTA (controles negativos) demonstram que as bandas são MMPs (B). Densitometria de gel mostra que o aumento de MMP9 é dose-dependente (B, gráfico inferior esquerdo). Asteriscos indicam dados significantes comparados aos controles (P<0.05). Resultados em A representam média ± de erro da média de três experimentos realizados pelo menos três vezes. Resultados em B representam média ± de erro da média de seis experimentos.



A) Vias de sinalização celular ativadas após ensaio de "ferida"

B) Inibição de ERK



Fig. 5

Fig. 5: Vias AKT e ERK estão "downstream" a C16. Células CAC2 foram submetidas a ensaio de "ferida" seguido de tratamento com C16. "Immunoblot" mostra aumento na fosforilação de AKT e ERK quando comparado a controles (DMEM e EGF) (A, painel esquerdo). C16 e EGF induziram expressão similar de p-FAK (A, painel esquerdo). Zimografia de médio condicionado de células CAC2 do ensaio de "ferida" mostra que C16 aumenta secreção de MMPs 2 e 9 (A, painel direito). Esses resultados foram confirmados tratando as células CAC2 com inibidor específico de ERK, UO126 (10, 25 e 50 µM) antes da adição de 100 µg/ml de C16 no meio de cultura. Diminuição da atividade de MMP foi observada através de zimografia (B, gel superior esquerdo). "Immunoblot" confirma a diminuição dos níveis de p-ERK (B, painel direito). Células CAC2 com ERK inibido e tratadas por C16SX não apresentam diferenças na atividade de protease (B, gel inferior esquerdo). Dois grupos controles para UO126 foram realizados: Em um deles células CAC2 foram tratadas com metanol e, no outro, as células foram crescidas somente em DMEM(B).





Fig. 6: Cromatografia de afinidade de membranas de células CAC2 identifica possíveis ligantes para C16. Frações eluídas de colunas de afinidade com C16 e C16SX foram visualizadas por coloração com Coomassie blue após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A fração eluída com EDTA 10 mM da coluna contendo C16 exibe banda de 40 kDa (A). Os pesos moleculares estão indicados. A banda eluída da coluna com C16 (A, área enquadrada) foi analisada por espectrometria de massa (LC/MSMS) e "peptide fingerprint" (A). A cadeia α1 do colágeno foi identificada. Imunofluorescência (B) e "immunoblot" (C) mostram que C16 aumenta a expressão do fragmento 1/4 do colágeno I, provavelmente o mesmo fragmento identificado pela espectrometria de massa. N: núcleo. Escala: 10 μm.

A) Imunofluorescência de integrinas



B) Cromatografia C16 + "immunoblot"



Fig. 7

Fig. 7: Integrinas expressas em células CAC2 (A) foram eluídas da coluna de afinidade de C16 e detectadas por "immunoblot" (B). Imunofluorescência mostra as integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ em células CAC2 (A). Frações de membrana e eluídas com EDTA e NaCl da coluna de afinidade com C16 acoplado foram submetidas a "immunoblot" com anticorpos contra as integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$. Bandas reativas nos pesos moleculares esperados para as integrinas αv , $\alpha 5$ e $\beta 1$ são observadas tanto nas frações de membrana quanto nos eluatos (B). Barra de escala: 10 µm.





Fig. 8

Fig. 8: Silenciamento das subunidades αν, β3, α5 e β1 mostra que integrinas regulam migração e de atividade protease em células CAC2. Células transfectadas e tratadas com C16 tiveram migração (A, lado esquerdo do gráfico) e atividade de proteases (B, zimograma esquerdo) diminuídas. Não houve diferença na migração (A, lado direito do gráfico) e secreção de protease (B, zimograma direito) em células CAC2 com integrinas silenciadas e tratadas com peptídeo controle, C16SX. "Immunoblot" confirma a eficácia de transfecção (C). Asteriscos em A indicam dados significantes quando comparados aos controles (P<0.05). Resultados da migração representam média ± de erro da média de triplicatas. Zimogramas foram realizados três vezes com resultados similares.</p>

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho demonstramos que a cadeia γ 1 da laminina-111 está presente no carcinoma adenóide cístico, neoplasia maligno de glândulas salivares. Essa cadeia contém o peptídeo C16, localizado no primeiro domínio globular do braço curto. C16 mostrou ser capaz de estimular atividades de migração, invasão e secreção de protease em células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano (células CAC2). Também investigamos os mecanismos regulatórios envolvidos nas atividades induzidas pelo peptídeo. Cromatografia de afinidade e espectrometria de massa sugerem fortemente que um complexo formado por colágeno I, integrinas e C16 regularia os processos nessas células. Silenciamento das integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e β1 por RNA de interferência promoveu redução na migração e na secreção de protease nas células CAC2 crescidas na presença de C16. Analisamos também as vias de sinalização que poderiam estar envolvidas no sinal gerado por C16. Verificamos que as vias ERK e AKT são ativadas pelo peptídeo nessas células. Adicionalmente, inibidor de MAPK diminuiu a secreção de proteases nas células CAC2, sugerindo que C16 pode sinalizar através de integrinas com a participação da via ERK. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato que estabeleceu relação entre C16, colágeno e integrinas mediando migração, invasão e secreção de protease em células de tumor através das vias de sinalização AKT e ERK.

A matriz extracelular (MEC) é composta por grande variedade de moléculas estruturais, como colágenos, glicoproteínas não-colágenas e proteoglicanos, que desempenham um papel complexo na regulação do comportamento das células com as quais fazem contato, influenciando seu desenvolvimento, crescimento, sobrevivência, migração, transdução de sinais, forma e função (ALBERTS et al., 2004; AUMAILLEY e GAYRAUD, 1998; BORG, 2004; BORNSTEIN e SAGE, 2002; COMOGLIO e TRUSOLINO, 2005; KLEINMAN et al., 2003; MINER e YURCHENCO, 2004; MOTT e WERB, 2004; PIEZ, 1997; PUPA et al., 2002; SCHENK e QUARANTA, 2003; VU, 2001; YURCHENCO e O'REAR, 1994).

A membrana basal, que é uma especialização da MEC, representa não somente um sólido suporte para as células, mas também atua como fonte de

citocinas e fatores de crescimento (AUMAILLEY et al., 2005; EKBLOM, 1996; KLEINMAN et al., 2003). Diversas linhas de pesquisa mostraram que componentes da matriz extracelular e da membrana basal contêm domínios crípticos, que são expostos através de proteólise e estimulam respostas biológicas diferentes daquelas estimuladas pelas moléculas intactas (FAISAL KHAN et al., 2002; MOTT e WERB, 2004; SCHENK e QUARANTA, 2003).

Dentre as proteínas da membrana basal, a laminina possui múltiplos sítios crípticos relacionados com diferentes atividades biológicas, incluindo adesão, migração, diferenciação, angiogênese e secreção de protease (FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; GRANT et al., 1992; HOFFMAN et al., 1998; MALINDA e KLEINMAN, 1996). Nosso laboratório já demonstrou que tanto a laminina-111 (antiga laminina-1) quanto alguns de seus peptídeos bioativos, como SIKVAV e AG73, regulam fenótipo e também atividades de linhagens celulares derivadas de carcinoma adenóide cístico (células CAC2) (FRANCA et al., 2000; FRANCA et al., 2001; FREITAS e JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; JAEGER et al., 2008; MORAIS FREITAS et al., 2007).

Outro interessante peptídeo bioativo derivado da laminina-111 é C16 (KAFDITYVRLKF), localizado no braço curto da cadeia γ 1, no primeiro domínio globular (KURATOMI et al., 2002; NOMIZU et al., 1997). A cadeia γ 1 está presente na maioria das isoformas de laminina, exceto a 332 (antiga laminina 5) e C16 está presente em pelo menos 11 de 13 lamininas (BURGESON et al., 1994; COLOGNATO e YURCHENCO, 2000; NOMIZU et al., 1997; PONCE e KLEINMAN, 2003). Inicialmente verificamos *in vivo* a expressão da cadeia γ 1 da laminina-111 no carcinoma adenóide cístico. Analisamos também a expressão *in vitro* dessa cadeia nas células derivadas do tumor.

Já foi demonstrado que neoplasias de glândula salivar expressam proeminente membrana basal, fenômeno particularmente interessante no carcinoma adenóide cístico. Resultados anteriores obtidos pelo nosso laboratório mostraram que o carcinoma adenóide cístico apresenta um significativo espessamento da membrana basal, que pode ser 40 vezes maior em relação à da junção derme-epiderme de um tecido normal (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008). Nossos resultados são apoiados por achados semelhantes aos de outros autores (TUNGGAL et al., 2002). Dessa forma, é óbvio que devido a esse aumento na espessura da membrana basal, pode-se esperar uma superprodução de componentes da membrana basal, como a laminina, no carcinoma adenóide cístico *in vivo*. Portanto, a expressão de laminina nesse tumor sem dúvida alguma ultrapassa a ocorrência da mesma em tecidos normais. Diante dessa alta expressão, assumimos que os efeitos observados em cultura com o peptídeo derivado da laminina C16 em células CAC2 estão dentro de um intervalo fisiológico.

Imunolocalização da cadeia γ1 no carcinoma adenóide cístico foi observada como uma estrutura linear, semelhante à membrana basal. Entretanto, algumas áreas mostravam ruptura dessa estrutura, evento que já foi observado anteriormente em áreas invadidas pelo carcinoma adenóide cístico (SHINTANI et al., 1997). Adicionalmente, em trabalhos anteriores demonstramos expressão *in vivo* e *in vitro* de MMP2 e MMP9 no carcinoma adenóide cístico (FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008). Lamininas são substratos para MMPs e as células do tumor secretam laminina (FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

Antes, acreditava-se que MMPs participavam do processo de invasão simplesmente através de degradação da matriz extracelular. Porém, hoje já se sabe que as modificações proteolíticas promovidas por essas enzimas em moléculas como a laminina, desempenham papel relevante em determinar a exposição de domínios e sítios crípticos presentes na estrutura íntegra das mesmas (GHOSH e STACK, 2000; MOTT e WERB, 2004; SCHENK e QUARANTA, 2003). Os sítios crípticos são sítios funcionais que estão enterrados no interior da estrutura das macromoléculas da matriz extracelular e, portanto não estão expostos na superfície das proteínas. A ativação dos sítios crípticos da matriz extracelular exige modificação estrutural das moléculas que pode ocorrer através processamento proteolítico (SCHENK e QUARANTA, 2003).

A laminina, quando clivada, expõe peptídeos bioativos que são seqüências de aminoácidos que podem ou não estarem crípticos na molécula íntegra (FREITAS et al., 2004; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008). Vários peptídeos bioativos têm mostrado regular o comportamento celular, e os domínios crípticos presentes na matriz podem estimular respostas biológicas nas células ao serem expostos por proteólise (DAVIS et al., 2000; FAISAL KHAN et al., 2002; MOTT e WERB, 2004; SCHENK e QUARANTA, 2003).

Peptídeos derivados da laminina estão envolvidos em diferentes atividades biológicas, incluindo adesão celular, espraiamento, crescimento, metástase tumoral, crescimento de neuritos e secreção de MMPs (SUZUKI et al., 2005). Diversas seqüências ativas presentes na laminina-111 foram identificadas através de fragmentos proteolíticos, proteínas recombinantes e sistema de escaneamento de peptídeos (NOMIZU et al., 1998; NOMIZU et al., 2000; NOMIZU et al., 1997). A seqüência YIGSR, localizada na cadeia β 1 promove adesão celular e migração, além de inibir angiogênese e metástase (GRAF et al., 1987; IWAMOTO et al., 1988; IWAMOTO et al., 1987). PDGSR e F-9 (RYVVLPR) são seqüências localizadas na cadeia β 1 que também promovem adesão celular (CHARONIS et al., 1988; SKUBITZ et al., 1990). SIKVAV e AG73, derivados da cadeia α 1, estão envolvidos com adesão celular, proliferação, crescimento de neuritos, formação de ácinos e atividade de protease (CORCORAN et al., 1995; FAISAL KHAN et al., 2002; FREITAS et al., 2004; HOFFMAN et al., 1998; TASHIRO et al., 1989).

Em relação ao C16, já foi descrito que esse peptídeo é capaz de promover angiogênese, migração, atividade de protease e metástase em diferentes sistemas (MALINDA et al., 2008; PONCE et al., 2003; PONCE e KLEINMAN, 2003). C16 também foi testado *in vivo* quanto à capacidade de estimular cicatrização, tendo sido observado que o peptídeo estimula migração de fibroblastos, contração de bordas da ferida, reepitelialização e angiogênese (MALINDA et al., 2008).

Quanto aos efeitos da laminina-111 e de seus peptídeos bioativos em tumores de glândula salivar, múltiplos sítios ativos já foram relacionados com as atividades de migração e invasão de células CAC2 (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; MORAIS FREITAS et al., 2007). YIGSR estimula migração e desorganização do complexo caderina-E- β -catenina nessas células (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; MORAIS FREITAS et al., 2007). SIKVAV, localizado na região terminal carboxílica da cadeia α 1, aumenta a atividade de protease de células CAC2 (FREITAS et al., 2007). AG73, presente no domínio globular LG4 da cadeia α 1, promove adesão e atividade de protease em células derivadas de carcinoma

adenóide cístico e de mioepitelioma (GAMA-DE-SOUZA et al., 2008; MORAIS FREITAS et al., 2007).

Nesse trabalho, uma série de experimentos mostrou que C16 aumenta migração e invasão de células CAC2. Podemos assim inferir que C16 desempenharia papel regulando a atividade invasiva do carcinoma adenóide cístico *in vivo.* O espalhamento do tumor depende de MMPs (GRANT et al., 1992; KHAN e FALCONE, 1997; KIBBEY et al., 1992; PINHEIRO et al., 2004; ROYCE et al., 1992). Ensaio de zimografia mostrou que C16 induziu um aumento dose-dependente de metaloproteases de matriz (MMPs), principalmente a MMP9, quando comparado ao controle.

As MMPs são uma família de mais de 23 enzimas caracterizadas pela habilidade de degradar a matriz extracelular e pela dependência de ligação a íons Zn²⁺ para que possam ter atividade proteolítica (CHANG e WERB, 2001; NAGASE e WOESSNER, 1999; STERNLICHT e WERB, 2001). MMPs podem ser tanto expressas constitutivamente como reguladas por numerosos fatores que podem ser estimuladores ou supressores. Esses fatores por sua vez, podem ser regulados por sinais derivados de integrinas, por proteínas da matriz extracelular, por estresse celular e por mudanças na forma da célula (STERNLICHT e WERB, 2001). Em adição, expressão de MMPs é regulada por citocinas, fatores de crescimento e indutores de metaloproteinases da matriz extracelular (EMMPRIN) (VISSE e NAGASE, 2003).

Evidências recentes vêm sugerindo um papel mais complexo das MMPs nas etapas anteriores e posteriores à degradação da matriz. Tanto as enzimas, quanto os seus inibidores se mostraram importantes reguladores de crescimento tumoral, atuando sobre os sítios primários e metastáticos das neoplasias. Os mecanismos parecem envolver regulação sobre o acesso aos fatores de crescimento provenientes da matriz extracelular, os quais rodeiam o tumor. Além de manter um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral, através dos mecanismos citados, as MMPs também são capazes de promover angiogênese (CHANG e WERB, 2001; NAGASE e WOESSNER, 1999; STERNLICHT e WERB, 2001; VISSE e NAGASE, 2003). Nesse contexto, entre as várias MMPs envolvidas na tumorigênese, estudos vêm mostrando que a MMP2 e a MMP9 desempenham papel relevante na progressão tumoral. Suas expressões aumentadas já foram observadas em várias neoplasias, e esse aumento quase sempre vem acompanhado de atividades invasiva e metastática maiores, que levam a uma diminuição da sobrevida do paciente (EGEBLAD e WERB, 2002).

Diante dos resultados, que mostraram papel funcional de C16 na migração, invasão e secreção de protease em células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano, nos interessamos em explorar quais mecanismos regulatórios estariam envolvidos nesses processos. Para isso, inicialmente analisamos as vias de sinalização que poderiam transduzir os sinais de C16.

Células CAC2 foram submetidas a ensaio de "ferida", que serviu como gatilho para as vias de sinalização relacionadas à migração celular. Em seguida, as células foram lisadas e "immunoblot" para proteínas fosforiladas relacionadas à diferentes cascatas de sinais mostrou que C16 promoveu aumento da fosforilação tanto de AKT quanto de ERK quando comparado aos controles. A via AKT está relacionada com diferentes funções como, sobrevivência, crescimento, proliferação, angiogênese e metabolismo celular. Se por um lado todas essas funções já estão bem estabelecidas, por outro, alguns trabalhos mais recentes têm descrito que AKT também regula as atividades de migração e invasão celulares (IRIE et al., 2005; MANNING e CANTLEY, 2007; TETREAULT et al., 2008; ZHOU et al., 2006). Alterações na via AKT, como aumento ou diminuição na sua fosforilação, estão envolvidas na tumorigênese, sendo que essas alterações já foram encontradas em diversas neoplasias (IRIE et al., 2005).

Já a atividade ERK regula transcrição de diferentes fatores envolvidos em processos fisiológicos e patológicos, incluindo embriogênese, cicatrização e progressão tumoral (FAISAL KHAN et al., 2002; KHAN e FALCONE, 1997; MORGAN et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que a via MAPK está relacionada com secreção de MMPs em células derivadas de neoplasia de glândula salivar. Achados experimentais do Laboratório já demonstraram que peptídeo SIKVAV, presente na cadeia α 1 da laminina-111, estimula secreção de MMPs sinalizando através da via ERK 1/2 (FREITAS et al., 2007). Meio condicionado do ensaio de "ferida" revelou um aumento na secreção de MMP2 e MMP9 pelas células

crescidas na presença de C16, quando comparadas às células controle. Complementando o estudo da via ERK, ensaio com o inibidor específico UO126, mostrou diminuição do efeito de C16 na secreção de proteases pelas células CAC2. Esses resultados sugerem que as vias AKT e ERK participam da regulação das atividades induzidas por C16 em células CAC2.

Também analisamos nesse trabalho possíveis receptores para C16. Cromatografia de afinidade revelou uma banda de 40 kDa eluída com solução de EDTA 10 mM da coluna de afinidade de C16. Essa banda foi identificada por espectrometria de massa como a cadeia α 1 do colágeno. Essa banda de 40kDa provavelmente representa um fragmento derivado de processamento proteolítico da molécula de colágeno I. É bem conhecido que essa proteína é substrato para MMPs. Trabalhos que realizaram análise de quebra de colágeno mostraram bandas de diferentes pesos moleculares, podendo variar entre 250-37 kDa (MADSEN et al., 2007; NYBERG et al., 2003). Algumas dessas bandas são conhecidas como $\alpha 1A$, $\alpha 2A$, $\alpha 1B \in \alpha 2B$, que indicam os característicos produtos de clivagem 3/4 e 1/4 resultantes da ação catalítica de colagenases sobre a molécula nativa, o colágeno tipo I (MADSEN et al., 2007; NYBERG et al., 2003). A primeira clivagem dessa proteína gera pequenos fragmentos que serão adicionalmente processados pelas MMPs 2 e 9 (MADSEN et al., 2007; NYBERG et al., 2003). Investigamos a relação entre o peptídeo C16 e o colágeno I nas células CAC2. Imunofluorescência e "immunoblot" mostraram que C16 aumenta a expressão do produto de clivagem, o fragmento 1/4 do colágeno I, quando comparado ao peptídeo controle, C16SX.

Vale ressaltar que nosso Laboratório possui dados envolvendo relação laminina-111 e colágeno I. Estudo envolvendo células CAC2 crescidas em ambiente tridimensional de gel de laminina-111 analisou os mecanismos regulatórios de secreção de moléculas presentes na matriz extracelular. Verificamos que laminina-111 aumenta a secreção tanto de colágeno I quanto de tenascina em células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano (JAEGER et al., 2008).

C16 é um peptídeo derivado da cadeia γ 1 da laminina-111, dessa forma, levantamos a hipótese de formação de um complexo protéico contendo colágeno I, C16 e outras moléculas em células CAC2. Dentre as possíveis moléculas que poderiam estar presentes nesse complexo protéico, as integrinas são fortes candidatas a interagirem tanto com C16 quanto com colágeno I e seus fragmentos.

Várias integrinas já foram descritas como receptores para a laminina e essas interações podem ser específicas ou não (PATARROYO et al., 2002). Integrinas também são receptores de colágeno (GULLBERG et al., 1992; HYNES, 2002; STAATZ et al., 1991), e a integrina $\alpha v\beta 3$, mais até que a integrina $\alpha 2\beta 1$, tem sido descrita como receptor de colágeno tipo I denaturado (DAVIS, 1992; JONES et al., 1997; MESSENT et al., 1998; MONTGOMERY et al., 1994). Adicionalmente, trabalhos mostraram que C16 pode interagir com colágeno I e fibronectina através das integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, respectivamente (PONCE et al., 2001).

As células podem expressar mais de um tipo funcional de integrinas que se liga à laminina, ou seja, diferentes integrinas podem estabelecer uma cooperação para promover reconhecimento específico de isoformas de laminina. Com isso, as células recebem estímulos e sinais de várias integrinas. Essas informações contribuem para um aumento da especificidade de ligação e, subseqüentemente sinalizam de uma maneira sinérgica (MERCURIO, 1995). Em tumores de glândula salivar, trabalho do Laboratório demonstrou que as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ interagem com peptídeo SIKVAV, derivado da cadeia $\alpha 1$, e parecem regular efeitos em células CAC2 (FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

Decidimos então analisar se as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ poderiam desempenhar papel regulando os efeitos de C16 nas células CAC2. Imunofluorescência mostrou que células CAC2 expressam as subunidades de integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$. Para complementar esse dado, analisamos em eluatos obtidos da coluna de afinidade de C16 a expressão das mesmas subunidades de integrinas. As amostras eluídas foram imunomarcadas com anticorpos para αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$. Bandas reativas para αv , $\alpha 5$ e $\beta 1$ foram observadas tanto na porção crua de membrana quanto nas frações eluídas. O mesmo não foi observado para a subunidade $\beta 3$. Os resultados obtidos na cromatografia de afinidade e na espectrometria de massa sugerem que as integrinas e o colágeno I estariam formando um complexo protéico com C16 nas células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano.

Integrinas desempenham importante papel mediando os efeitos profundos da laminina no comportamento celular, incluindo adesão, migração e diferenciação (MERCURIO, 1995; PATARROYO et al., 2002). São autênticos receptores que ao se ligarem a essa glicoproteína modulam as vias de sinalização intracelular em resposta à ligação. A lista de integrinas que se ligam à laminina é grande e as propriedades relacionadas à ligação e a importância biológica variam consideravelmente (MERCURIO, 1995; PATARROYO et al., 2002).

Dentro desse contexto, os resultados obtidos nos estimularam a estudar se diferentes integrinas poderiam regular as atividades de migração e secreção de protease induzidas por C16 nas células CAC2. Para isso, células com expressão reduzida das integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ foram crescidas na presença de C16 e submetidas a ensaio de migração em câmaras bipartites. Em paralelo, o meio condicionado do ensaio de migração foi recolhido e analisado em zimografia quanto a secreção das MMPs 2 e 9. Células CAC2 com as integrinas silenciadas tiveram tanto a migração quanto a atividade de protease reduzidas. Esses resultados sugerem, portanto, que o sinal gerado por C16 seria transduzido pelas integrinas αv , $\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$.

A capacidade que um tumor maligno tem de se espalhar para outros tecidos e órgãos envolve uma série de diferentes moléculas, tais como enzimas proteolíticas, moléculas de adesão, receptores celulares, citocinas e fatores de crescimento. Um complexo sistema de transdução de sinais através de vias transmite mensagens provenientes da matriz extracelular via receptores de membrana e moléculas intracelulares até o núcleo, resultando em ativação e síntese de fatores de transcrição de diferentes genes (DAVIDSON et al., 2003).

É evidente que compreender as interações entre células cancerosas e células hospedeiras é crucial para o estudo da patogênese do câncer. O conhecimento dos efeitos biológicos de peptídeos derivados de laminina, como o C16, ainda está fragmentado, sem uma seqüência clara de eventos definidos. Nossos resultados são uma tentativa de conectar vários eventos biológicos para melhor compreender o papel desempenhado por esse peptídeo nas neoplasias de glândulas salivares. Baseado em nossos achados experimentais sugerimos que C16 aumenta migração, invasão e secreção de protease em células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano através de interação com fragmentos de colágeno, heterodímeros de integrinas, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$. O sinal gerado por C16 é transduzido pelas vias de sinalização AKT e ERK.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados dos experimentos realizados, concluímos que:

- 1) A cadeia γ1 da laminina é expressa *in vivo* e *in vitro* no carcinoma adenóide cístico.
- C16 induz atividades de migração, invasão e secreção de protease em células CAC2.
- 3) O sinal gerado por C16 é transduzido por AKT e ERK .
- 4) C16 interage com colágeno I e integrinas
- 5) As atividades de migração e secreção de MMPs induzidas por C16 tem participação de integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 31$.
REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* (Ed.). **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.1463.

AUMAILLEY, M. Structure and supramolecular organization of basement membranes. **Kidney Int. Suppl.,** v. 49, p. S4-7, 1995.

AUMAILLEY, M. et al. A simplified laminin nomenclature. Matrix Biol., v. 24, n. 5, p. 326-32, 2005.

AUMAILLEY, M., GAYRAUD, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. **J. Mol. Med.**, v. 76, n. 3-4, p. 253-65, 1998.

AUMAILLEY, M.; KRIEG, T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 106, n. 2, p. 209-214, 1996.

BATSAKIS, J. G. The pathology of head and neck tumors: nasal cavity and paranasal sinuses, part 5. **Head Neck Surg.**, v. 2, n. 5, p. 410-9, 1980.

BERDITCHEVSKI, F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. **J. Cell Sci.,** v. 114, n. Pt23, p. 4143-51, 2001.

BERGERS, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 10, p.737-44, 2000.

BIANCHI, B. *et al.* Adenoid cystic carcinoma of intraoral minor salivary glands. **Oral. Oncol.**, 2008. In press.

BIRK, D. E. *et al.* Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. **Dev. Dyn.,** v. 208, n. 3, p. 291-8, 1997.

BJORKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1755, n. 1, p. 37-69, 2005.

BORG, T. K. It's the matrix! ECM, proteases, and cancer. **Am. J. Pathol.,** v. 164, n. 4, p. 1141-2, 2004.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, n. 5, p. 608-16, 2002.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 423-8, 2003.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUCCIONE, R. *et al.* Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 8, p. 647-57, 2004.

BURGESON, R. E. *et al.* A new nomenclature for the laminins. **Matrix Biol.**, v. 14, n. 3, p. 209-11, 1994.

CALDERWOOD, D. A. *et al.* The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. **J. Biol. Chem.,** v. 274, n. 40, p. 28071-4, 1999.

CAPUANO, A. C.; JAEGER, R. G. The effect of laminin and its peptide SIKVAV on a human salivary gland myoepithelioma cell line. **Oral Oncol.**, v. 40, n. 1, p. 36-42, 2004.

CHAMBERS, A. F.; MATRISIAN, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 89, n. 17, p. 1260-70, 1997.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 11, p. S37-43, 2001.

CHARONIS, A. S. *et al.* A novel synthetic peptide from the B1 chain of laminin with heparin-binding and cell adhesion-promoting activities. **J. Cell Biol.**, v. 107, n. 3, p. 1253-60, 1988.

CHAUDHRY, A. P. *et al.* Histogenesis of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. Light and electronmicroscopic study. **Cancer**, v. 58, n. 1, p. 72-82, 1986.

CHEN, W. T.; SINGER, S. J. Immunoelectron microscopic studies of the sites of cellsubstratum and cell-cell contacts in cultured fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 95, n. 1, p.205-22, 1982.

CHENG, J. *et al.* Biosynthesis of basement membrane molecules by salivary adenoid cystic carcinoma cells: an immunofluorescence and confocal microscopic study. **Virchows Arch.,** v. 426, n. 6, p. 577-86, 1995.

CHENG, J. *et al.* Basement membranes in adenoid cystic carcinoma. An immunohistochemical study. **Cancer,** v. 69, n. 11, p. 2631-40, 1992.

CHOMETTE, G. *et al.* Adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. Analysis of 86 cases. Clinico-pathological, histoenzymological and ultrastructural studies. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.**, v. 395, n. 3, p. 289-301, 1982.

CHUNG, A. E. *et al.* Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. **Cell**, v. 16, n. 2, p. 277-87, 1979.

COLOGNATO-PYKE, H. *et al.* Mapping of network-forming, heparin-binding, and alpha 1 beta 1 integrin-recognition sites within the alpha-chain short arm of laminin-1. **J. Biol. Chem.,** v. 270, n. 16, p. 9398-406, 1995.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev. Dyn.,** v. 218, n. 2, p. 213-34, 2000.

COMOGLIO, P. M.; TRUSOLINO, L. Cancer: the matrix is now in control. **Nat. Med.**, v. 11, n. 11, p. 1156-9, 2005.

COOPER, A. R. *et al.* Studies on the biosynthesis of laminin by murine parietal endoderm cells. **Eur. J. Biochem.,** v. 119, n. 1, p.189-97, 1981.

COPPOLINO, M. G.; DEDHAR, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. Int. J. Biochem. Cell Biol., v. 32, n. 2, p.171-88, 2000.

CORCORAN, M. L. *et al.* Laminin SIKVAV peptide induction of monocyte/macrophage prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 18, p. 10365-8, 1995.

D'ARDENNE, A. J. *et al.* Laminin and fibronectin in adenoid cystic carcinoma. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, n. 2, p. 138-44, 1986.

DAMSKY, C. H. *et al.* Distribution of the cell substratum attachment (CSAT) antigen on myogenic and fibroblastic cells in culture. **J. Cell Biol.**, v. 100, n. 5, p. 1528-39, 1985.

DARDICK, I. Salivary Gland Tumor Pathology. New York: Igaku-Shoin, 1996.

DAVIDSON, B. *et al.* Coordinated expression of integrin subunits, matrix metalloproteinases (MMP), angiogenic genes and Ets transcription factors in advanced-stage ovarian carcinoma: a possible activation pathway? **Cancer Metastasis Rev.,** v. 22, n. 1, p. 103-15, 2003.

DAVIS, G. E. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 182, n. 3, p. 1025-31, 1992.

DAVIS, G. E. *et al.* Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. **Am. J. Pathol.,** v. 156, n. 5, p. 1489-98, 2000.

DE MELKER, A. A.; SONNENBERG, A. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. **Bioessays**, v. 21, n. 6, p. 499-509, 1999.

DE OLIVEIRA, P. T. *et al.* The effect of a reconstituted basement membrane (matrigel) on a human salivary gland myoepithelioma cell line. **Virchows Arch.,** v. 439, n. 4, p. 571-8, 2001.

DEDHAR, S.; HANNIGAN, G. E. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 657-69, 1996.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer,** v. 2, n. 3,p. 161-74, 2002.

EKBLOM, M. et al. Laminin isoforms and epithelial development. Ann. NY Acad. Sci., v. 857, p. 194-211, 1998.

EKBLOM, P. Extracellular matrix and cell adhesion molecules in nephrogenesis. **Exp. Nephrol.,** v. 4, n. 2, p. 92-6, 1996.

EKBLOM, P. *et al.* Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. **Development,** v. 120, n. 7, p. 2003-14, 1994.

EKBLOM, P. *et al.* Expression and biological role of laminin-1. **Matrix Biol.,** v. 22, n. 1, p. 35-47, 2003.

EL-NAGGAR, A. K.; HUVOS, A. G. Salivary Glands - Adenoid Cystic Carcinoma. In: BARNES, L. *et al.* (Ed.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005. p. 221-222.

ELLERBROEK, S. M. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. **Cancer Res.**, v. 61, n. 5, p. 1855-61, 2001.

ETHUNANDAN, M. *et al.* Primary epithelial submandibular salivary gland tumours - Review of management in a district general hospital setting. **Oral Oncol.**, 2008. In press.

EVERSOLE, L. R. Histogenic classification of salivary tumors. **Arch. Pathol.,** v. 92, n. 6, p. 433-43, 1971.

FAISAL KHAN, K. M. *et al.* Exposure of cryptic domains in the alpha 1-chain of laminin-1 by elastase stimulates macrophages urokinase and matrix metalloproteinase-9 expression. **J. Biol. Chem.,** v. 277, n. 16, p. 13778-86, 2002.

FRANCA, C. M. *et al.* The role of basement membrane proteins on the expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in an adenoid cystic carcinoma cell line. **Oral Oncol.**, v. 36, n. 2, p. 248-52, 2000.

FRANCA, C. M. *et al.* Effect of N-CAM on in vitro invasion of human adenoid cystic carcinoma cells. **Oral Oncol.**, v. 37, n. 8, p. 638-42, 2001.

FREITAS, V. M.; JAEGER, R. G. The effect of laminin and its peptide SIKVAV on a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Virchows Arch.,** v. 441, n. 6, p. 569-76, 2002.

FREITAS, V. M. *et al.* Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Oral Oncol.**, v. 40, n. 5, p. 483-9, 2004.

FREITAS, V. M. *et al.* SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **Am. J. Pathol.,** v. 171, n. 1, p. 124-38, 2007.

FRIEDMAN, E. W.; SCHWARTZ, A. E. Diagnosis of salivary gland tumors. **CA Cancer J. Clin.,** v. 24, n. 5, p. 266-73, 1974.

FRIEDRICHS, K. *et al.* High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. **Cancer Res.**, v. 55, n. 4, p. 901-6, 1995.

GAMA-DE-SOUZA, L. N. *et al.* Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and beta1 integrin. **Matrix Biol.**, v. 27, n. 5, p. 402-19, 2008.

GARDEN, A. S. *et al.* The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.,** v. 32, n. 3, p. 619-26, 1995.

GHOSH, S.; STACK, M. S. Proteolytic modification of laminins: functional consequences. **Microsc. Res. Tech.,** v. 51, n. 3, p. 238-46, 2000.

GIANCOTTI, F. G.; TARONE, G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.,** v. 19, p. 173-206, 2003.

GLEAVE, M. E. *et al.* Epidermal growth factor receptor-mediated autocrine and paracrine stimulation of human transitional cell carcinoma. **Cancer Res.,** v. 53, n. 21, p. 5300-7, 1993.

GRAF, J. *et al.* A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor. **Biochemistry**, v. 26, n. 22, p. 6896-900, 1987.

GRANT, D. S. *et al.* Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. **J. Cell Physiol.**, v. 153, n. 3, p. 614-25, 1992.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 48, p. 1014-22, 1962.

GUDJONSSON, T. *et al.* Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. **J. Cell Sci.**, v. 115, n. Pt 1, p. 39-50, 2002.

GULLBERG, D. *et al.* Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 integrins in cell--collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I. **Embo J.**, v. 11, n. 11, p. 3865-73, 1992.

HANDSLEY, M. M.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 115, n. 6, p. 849-60, 2005.

HOFFMAN, M. P. *et al.* Role of laminin-1 and TGF-beta 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). **J. Cell Sci.**, v. 109, p. 2013-21, 1996.

HOFFMAN, M. P. *et al.* Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. **J. Biol. Chem.,** v. 273, n. 44, p. 28633-41, 1998.

HUANG, M. *et al.* Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.,** v. 26, n. 6, p. 435-9, 1997.

HUMPHRIES, M. J. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. **Curr. Opin. Cell Biol.,** v. 8, n. 5, p. 632-40, 1996.

HUTTENLOCHER, A. *et al.* Adhesion in cell migration. **Curr. Opin. Cell Biol.,** v. 7, n. 5, p. 697-706, 1995.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 4, p. 549-54, 1987.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11-25, 1992.

HYNES, R. O. Cell adhesion: old and new questions. **Trends Cell Biol.,** v. 9, n. 12, p. M33-7, 1999.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-87, 2002.

HYNES, R. O. Structural biology. Changing partners. **Science,** v. 300, n. 5620, p. 755-6, 2003.

IRIE, H. Y. *et al.* Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. **J. Cell Biol.**, v. 171, n. 6, p. 1023-34, 2005.

ITO, F. A. *et al.* Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.,** v. 34, n. 5, p. 533-6, 2005.

IWAMOTO, Y. *et al.* Synthetic pentapeptide from the B1 chain of laminin promotes B16F10 melanoma cell migration. **J. Cell Physiol.**, v. 134, n. 2, p. 287-91, 1988.

IWAMOTO, Y. *et al.* YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. **Science**, v. 238, n. 4830, p. 1132-4, 1987.

JAEGER, M. M. *et al.* Effect of spatial arrangement of the basement membrane on cultured pleomorphic adenoma cells. Study by immunocytochemistry and electron and confocal microscopy. **Virchows Arch.**, v. 430, n. 6, p. 467-77, 1997.

JAEGER, R. G. *et al.* Expression of smooth-muscle actin in cultured cells from human plasmacytoid myoepithelioma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.,** v. 84, n. 6, p. 663-7, 1997.

JAEGER, R. G. *et al.* Secretion of collagen I and tenascin is modulated by laminin-111 in 3D culture of human adenoid cystic carcinoma cells. **Int. J. Exp. Pathol.,** v. 89, n. 2, p. 98-105, 2008.

JONES, P. L. *et al.* Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. **J. Cell Biol.**, v. 139, n. 1, p. 279-93, 1997.

KADLER, K. E. et al. Collagen fibril formation. Biochem. J., v. 316, p. 1-11, 1996.

KADOYA, Y. *et al.* Laminin alpha1 chain G domain peptide, RKRLQVQLSIRT, inhibits epithelial branching morphogenesis of cultured embryonic mouse submandibular gland. **Dev. Dyn.,** v. 212, n. 3, p. 394-402, 1998.

KAMAL, M. M. *et al.* Cytodiagnosis of dermal cylindroma. **Acta Cytol.,** v. 40, n. 2, p. 375-6, 1996.

KANEMOTO, T. *et al.* Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 87, n. 6, p. 2279-83, 1990.

KHAN, K. M.; FALCONE, D. J. Role of laminin in matrix induction of macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression. J. Biol. Chem., v. 272, n. 13, p. 8270-5, 1997.

KIBBEY, M. C. *et al.* Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth: an in vivo Matrigel model. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 84, n. 21, p. 1633-8, 1992.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, n. 5, p. 378-86, 2005.

KLEINMAN, H. K. *et al.* Formation of a supramolecular complex is involved in the reconstitution of basement membrane components. **Biochemistry**, v. 22, n. 21, p. 4969-74, 1983.

KLEINMAN, H. K. *et al.* Role of the extracellular matrix in morphogenesis. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, n. 5, p. 526-32, 2003.

KURATOMI, Y. *et al.* Laminin gamma 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells. **Br. J. Cancer,** v. 86, n. 7, p. 1169-73, 2002.

KUTLESA, S. *et al.* Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms. **Immunology**, v. 105, n. 4, p. 407-18, 2002.

LAM, K. Y.; YUEN, A. P. Cancer of the larynx in Hong Kong: a clinico-pathological study. **Eur. J. Surg. Oncol.,** v. 22, n. 2, p. 166-70, 1996.

LEE, M. H.; MURPHY, G. Matrix metalloproteinases at a glance. J. Cell Sci., v. 117, n. Pt 18, p. 4015-6, 2004.

LIOTTA, L. A. Molecular biology of metastases: a review of recent approaches. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.,** v. 22, n. 3, p. 345-8, 1986.

LOH, K. S. *et al.* Prognostic factors in malignancy of the minor salivary glands. **Head Neck**, 2008. In press,

LOYOLA, A. M. *et al.* Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.,** v. 31B, n. 3, p. 197-201, 1995.

LUGASSY, C. *et al.* Angio-tumoral complex in human malignant melanoma characterised by free laminin: ultrastructural and immunohistochemical observations. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.,** v. 29, n. 1, p. 19-28, 1997.

LYNCH, C. C.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 561-73, 2002.

MACIEJEWSKI, *et al.* Outcome of surgery for adenoid cystic carcinoma of head and neck region. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 30, n. 1, p. 59-61, 2002.

MADSEN, D. H. *et al.* Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. **J. Biol. Chem.,** v. 282, n. 37, p. 27037-45, 2007.

MALINDA, K. M.; KLEINMAN, H. K. The laminins. Int. J. Biochem. Cell Biol., v. 28, n. 9, p. 957-9, 1996.

MALINDA, K. M. *et al.* Angiogenic laminin-derived peptides stimulate wound healing. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40, n. 12, p. 2771-80, 2008.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261-74, 2007.

MARTIN, G. R. *et al.* The regulation of basement membrane formation and cellmatrix interactions by defined supramolecular complexes. **Ciba Found Symp.**, v. 108, p. 197-212, 1984.

MARTIN, G. R.; TIMPL, R. Laminin and other basement membrane components. **Annu. Rev. Cell Biol.,** v. 3, p. 57-85, 1987.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, n. 5, p. 534-40, 2001.

MELO, E. S. Laminina e seu peptídeo bioativo AG73 como modulador do fenótipo de linhagem celular derivada de carcinoma adenóide cístico humano. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MERCURIO, A. M. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. **Trends Cell Biol.**, v. 5, n. 11, p. 419-23, 1995.

MESSENT, A. J. *et al.* Effects of collagenase-cleavage of type I collagen on alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **J. Cell Sci.,** v. 111, p. 1127-35, 1998.

MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 255-84, 2004.

MIRA, E. *et al.* Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. **J. Cell Sci.,** v. 117, n. Pt 9, p. 1847-57, 2004.

MIRANTI, C. K.; BRUGGE, J. S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, n. 4, p. E83-90, 2002.

MONTGOMERY, A. M. *et al.* Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 19, p. 8856-60, 1994.

MORAIS FREITAS, V. *et al.* Malignancy-related 67kDa laminin receptor in adenoid cystic carcinoma. Effect on migration and beta-catenin expression. **Oral Oncol.,** v. 43, n. 10, p. 987-98, 2007.

MORGAN, M. R. *et al.* The integrin cytoplasmic-tail motif EKQKVDLSTDC is sufficient to promote tumor cell invasion mediated by matrix metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9. **J. Biol. Chem.,** v. 279, n. 25, p.26533-9, 2004.

MOSCATELLI, D.; RIFKIN, D. B. Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 948, n. 1, p. 67-85, 1988.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, n. 5, p. 558-64, 2004.

MYLIUS, E. A. The identification and the role of the myoepithelial cell in salivary gland tumours. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.,** v. 50, p. 1-81, 1960.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens and collagen-related diseases. **Ann. Med.,** v. 33, n. 1, p. 7-21, 2001.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem., v. 274, n. 31, p. 21491-4, 1999.

NAIDET, C. *et al.* Peptides containing the cell-attachment recognition signal Arg-Gly-Asp prevent gastrulation in Drosophila embryos. **Nature**, v. 325, n. 6102, p. 348-50, 1987.

NEVILLE, B. D. *et al.* Patologia de Glândulas Salivares. In: NEVILLE, B. D. *et al.* (Ed.). **Patologia Oral & Maxilofacial.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.314-352.

NOMIZU, M. *et al.* Identification of cell binding sites in the laminin alpha 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. **J. Biol. Chem.,** v. 270, n. 35, p. 20583-90, 1995.

NOMIZU, M. *et al.* Cell binding sequences in mouse laminin alpha1 chain. J. Biol. Chem., v. 273, n. 49, p. 32491-9, 1998.

NOMIZU, M. *et al.* Cell adhesive sequences in mouse laminin beta1 chain. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 378, n. 2, p. 311-20, 2000.

NOMIZU, M. *et al.* Identification of cell binding sequences in mouse laminin gamma1 chain by systematic peptide screening. **J. Biol. Chem.,** v. 272, n. 51, p. 32198-205, 1997.

NOMIZU, M. *et al.* The all-D-configuration segment containing the IKVAV sequence of laminin A chain has similar activities to the all-L-peptide in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.,** v. 267, n. 20, p. 14118-21, 1992.

NOMIZU, M. *et al.* Identification of homologous biologically active sites on the N-terminal domain of laminin alpha chains. **Biochemistry**, v. 40, n. 50, p. 15310-7, 2001.

NYBERG, P. *et al.* Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloprotease-2, -9, and -13. **J. Biol. Chem.,** v. 278, n. 25, p. 22404-11, 2003.

O'TOOLE, T. E. *et al.* Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. **J. Cell Biol.**, v. 124, n. 6, p. 1047-59, 1994.

OLIVEIRA, E. C. Laminina-1 e seu peptídeo AG73 regulando a morfologia e atividade proteolítica de linhagem celular derivada de mioepitelioma humano. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

OSBORN, D. A. Morphology and the natural history of cribriform adenocarcinoma (adenoid cystic carcinoma). **J. Clin. Pathol.,** v. 30, n. 3, p. 195-205, 1977.

OVERALL, C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat. Rev. Cancer,** v. 2, n. 9, p. 657-72, 2002.

PAGE-MCCAW, A. *et al.* Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,** v. 8, n. 3, p. 221-33, 2007.

PARSONS, J. T. *et al.* Management of minor salivary gland carcinomas. **Int. J. Radiat. Oncol Biol. Phys.,** v. 35, n. 3, p. 443-54, 1996.

PATARROYO, M. *et al.* Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 12, n. 3, p. 197-207, 2002.

PAULSSON, M. Noncollagenous proteins of basement membranes. **Coll. Relat. Res.,** v. 7, n. 6, p. 443-61, 1987.

PFAFF, M. *et al.* Binding of purified collagen receptors (alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1) and RGD-dependent integrins to laminins and laminin fragments. **Eur. J. Biochem.**, v. 225, n. 3, p. 975-84, 1994.

PIERSCHBACHER, M. *et al.* Synthetic peptide with cell attachment activity of fibronectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, n. 5, p. 1224-7, 1983.

PIEZ, K. A. History of extracellular matrix: a personal view. **Matrix Biol.,** v. 16, n. 3, p. 85-92, 1997.

PINHEIRO, J. J. *et al.* Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. **Histopathology**, v. 45, n. 1, p. 65-72, 2004.

PONCE, M. L. *et al.* Identification of a potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. **Cancer Res.**, v. 63, n. 16, p. 5060-4, 2003.

PONCE, M. L.; KLEINMAN, H. K. Identification of redundant angiogenic sites in laminin alpha1 and gamma1 chains. **Exp. Cell Res.,** v. 285, n. 2, p. 189-95, 2003.

PONCE, M. L. *et al.* Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain. **Circ. Res.,** v. 84, n. 6, p. 688-94, 1999.

PONCE, M. L. *et al.* An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. **Faseb J.**, v. 15, n. 8, p. 1389-97, 2001.

POWELL, S. K.; KLEINMAN, H. K. Neuronal laminins and their cellular receptors. Int. J. Biochem. Cell Biol., v. 29, n. 3, p. 401-14, 1997.

POWELL, S. K. *et al.* Laminin-like proteins are differentially regulated during cerebellar development and stimulate granule cell neurite outgrowth in vitro. **J. Neurosci. Res.,** v. 54, n. 2, p. 233-47, 1998.

PUPA, S. M. *et al.* New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. **J. Cell Physiol.**, v. 192, n. 3, p. 259-67, 2002.

RAITZ, R. *et al.* A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, n. 5, p. 290-6, 2003.

REGEZI, J. A.; BATSAKIS, J. G. Histogenesis of salivary gland neoplasms. **Otolaryngol. Clin. North. Am.,** v. 10, n. 2, p. 297-307, 1977.

RENEHAN, A. G. *et al.* Clinico-pathological and treatment-related factors influencing survival in parotid cancer. **Br. J. Cancer**, v. 80, n. 8, p. 1296-300, 1999.

REUNANEN, N. *et al.* Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. **J. Biol. Chem.,** v. 277, n. 35, p. 32360-8, 2002.

RIALAS, C. M. *et al.* Nitric oxide mediates laminin-induced neurite outgrowth in PC12 cells. **Exp. Cell Res.**, v. 260, n. 2, p.268-76, 2000.

RICHARD, B. L. *et al.* Identification of synthetic peptides derived from laminin alpha1 and alpha2 chains with cell type specificity for neurite outgrowth. **Exp. Cell Res.**, v. 228, n. 1, p .98-105, 1996.

RICHARDSON, A.; PARSONS, J. T. Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? **Bioessays**, v. 17, n. 3, p. 229-36, 1995.

ROYCE, L. S. *et al.* Induction of an invasive phenotype in benign tumor cells with a laminin A-chain synthetic peptide. **Invasion Metastasis**, v. 12, n. 3-4, p. 149-55, 1992.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J. Cell Mol. Med., v. 9, n. 2, p. 267-85, 2005.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. **Cell**, v. 44, n. 4, p. 517-8, 1986.

SAKU, T. *et al.* Immunolocalization of basement membrane molecules in the stroma of salivary gland pleomorphic adenoma. **J. Oral Pathol. Med.,** v. 19, n. 5, p. 208-14, 1990.

SASAKI, T. *et al.* Laminin: the crux of basement membrane assembly. **J. Cell Biol.**, v. 164, n. 7, p. 959-63, 2004.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. **Trends Cell Biol.**, v. 13, n. 7, p. 366-75, 2003.

SCHNAPER, H. W. *et al.* Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation. **Kidney Int.,** v. 43, n. 1, p. 20-5, 1993.

SEIFERT, G.; SOBIN, L. H. The World Health Organization's Histological Classification of Salivary Gland Tumors. A commentary on the second edition. **Cancer**, v. 70, n. 2, p. 379-85, 1992.

SHINTANI, S. *et al.* Extracellular matrices expression in invasion area of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. **Cancer Lett.**, v. 116, n. 1, p. 9-14, 1997.

SIMPSON, J. R. *et al.* Adenoid cystic salivary gland carcinoma: treatment with irradiation and surgery. **Radiology**, v. 151, n. 2, p. 509-12, 1984.

SKUBITZ, A. P. *et al.* Definition of a sequence, RYVVLPR, within laminin peptide F-9 that mediates metastatic fibrosarcoma cell adhesion and spreading. **Cancer Res.**, v. 50, n. 23, p. 7612-22, 1990.

SONNENBERG, A. *et al.* Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that alpha 6 beta 1 but not alpha 6 beta 4 functions as a major receptor for fragment E8. **J. Cell Biol.**, v. 110, n. 6, p. 2145-55, 1990.

STAATZ, W. D. *et al.* Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen. **J. Biol. Chem.,** v. 266, n. 12, p. 7363-7, 1991.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J. Pathol.,** v. 200, n. 4, p. 448-64, 2003.

STERNLICHT, M. D., WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p. 463-516, 2001.

STICKENS, D. *et al.* Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. **Development**, v. 131, n. 23, p. 5883-95, 2004.

SUBHASHRAJ, K. Salivary gland tumors: a single institution experience in India. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 46, n. 8, p. 635-8, 2008.

SUNG, U. *et al.* Cell and heparin binding in the distal long arm of laminin: identification of active and cryptic sites with recombinant and hybrid glycoprotein. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 5, p. 1255-68, 1993.

SUZUKI, N. *et al.* Functional sites in the laminin alpha chains. **Connect. Tissue Res.,** v. 46, n. 3, p. 142-52, 2005.

SWASH, M. Invasion of cranial nerves by salivary cylindroma: four cases treated by radiotherapy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,** v. 34, n. 4, p. 475-80, 1971.

TAMKUN, J. W. *et al.* Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 271-82, 1986.

TASHIRO, K. *et al.* A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. **J. Biol. Chem.,** v. 264, n. 27, p. 16174-82, 1989.

TETREAULT, M. P. *et al.* Epidermal growth factor receptor-dependent PI3Kactivation promotes restitution of wounded human gastric epithelial monolayers. **J. Cell Physiol.**, v. 214, n. 2, p. 545-57, 2008. THORSEN, F.; TYSNES, B. B. Brain tumor cell invasion, anatomical and biological considerations. **Anticancer Res.**, v. 17, n. 6B, p. 4121-6, 1997.

TIMPL, R. Macromolecular organization of basement membranes. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 618-24, 1996.

TIMPL, R.; BROWN, J. C. The laminins. Matrix Biol., v. 14, n. 4, p. 275-81, 1994.

TIMPL, R.; BROWN, J. C. Supramolecular assembly of basement membranes. **Bioessays,** v. 18, n. 2, p. 123-32, 1996.

TIMPL, R. *et al.* Characterization of pepsin fragments of basement membrane collagen obtained from a mouse tumor. **Eur. J. Biochem.,** v. 95, n. 2, p. 255-63, 1979.

TIMPL, R. *et al.* Immunochemical study on basement membrane (type IV) collagens. **Immunology**, v. 38, n. 1, p. 109-16, 1979.

TIMPL, R. *et al.* Identification of a new basement membrane collagen by the aid of a large fragment resistant to bacterial collagenase. **FEBS Lett.,** v. 101, n. 2, p. 265-8, 1979.

TIMPL, R. *et al.* Laminin--a glycoprotein from basement membranes. J. Biol. Chem., v. 254, n. 19, p. 9933-7, 1979.

TIMPL, R. *et al.* Structure and function of laminin LG modules. **Matrix Biol.,** v. 19, n. 4, p. 309-17, 2000.

TRINH, N. T. *et al.* Involvement of KATP and KvLQT1 K+ channels in EGFstimulated alveolar epithelial cell repair processes. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 293, n. 4, p. L870-82, 2007.

TUNGGAL, L. *et al.* Defective laminin 5 processing in cylindroma cells. **Am. J. Pathol**, v. 160, n. 2, p. 459–468, 2002.

VIHINEN, P.; KAHARI, V. M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. **Int. J. Cancer**, v. 99, n. 2, p. 157-66, 2002.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v. 92, n. 8, p. 827-39, 2003.

VOGEL, V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.,** v. 35, p. 459-88, 2006.

VU, T. H. Don't mess with the matrix. Nat. Genet., v. 28, n. 3, p. 202-3, 2001.

WEEKS, B. S. *et al.* Laminin-1 and the RKRLQVQLSIRT laminin-1 alpha1 globular domain peptide stimulate matrix metalloproteinase secretion by PC12 cells. **Exp. Cell Res.**, v. 243, n. 2, p. 375-82, 1998.

WEEKS, B. S. *et al.* The role of protein kinase C in laminin-mediated neurite outgrowth. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 256, n. 1, p. 98-103, 1999.

WISEMAN, B. S. *et al.* Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. **J. Cell Biol**, v. 162, n. 6, p. 1123-33, 2003.

WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **Faseb J.**, v. 5, n. 8, p. 2145-54, 1991.

WOESSNER, J. F., JR. MMPs and TIMPs. An historical perspective. **Methods Mol. Biol.**, v. 151, p. 1-23, 2001.

WOESSNER, J. F., JR. MMPs and TIMPs--an historical perspective. **Mol. Biotechnol.**, v. 22, n. 1, p. 33-49, 2002.

WOODLEY, D. T. *et al.* Interactions of basement membrane components. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 761, n. 3, p. 278-83, 1983.

WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. **Mol. Biol. Cell**, v. 5, n. 2, p. 183-92, 1994.

WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Integrin modulation by lateral association. J. Biol. Chem., v. 275, n. 32, p. 24233-6, 2000.

YAMADA, K. M.; MIYAMOTO, S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. **Curr. Opin., Cell Biol.,** v. 7, n. 5, p. 681-9, 1995.

YAMASHITA, H. *et al.* Cryptic fragment alpha4 LG4-5 derived from laminin alpha4 chain inhibits de novo adipogenesis by modulating the effect of fibroblast growth factor-2. **Dev. Growth Differ.,** v. 50, n. 2, p. 97-107, 2008.

YURCHENCO, P. D. Assembly of basement membranes. Ann. NY Acad. Sci., v. 580, p. 195-213, 1990.

YURCHENCO, P. D. *et al.* Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol.**, v. 22, n. 7, p. 521-38, 2004.

YURCHENCO, P. D.; O'REAR, J. J. Basement membrane assembly. **Methods Enzymol.**, v. 245, p. 489-518, 1994.

YURCHENCO, P. D. *et al.* Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. **J. Biol. Chem,** v. 260, n. 12, p. 7636-44, 1985.

YURCHENCO, P. D.; WADSWORTH, W. G. Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, n. 5, p. 572-9, 2004.

ZHOU, G. L. *et al.* Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 47, p. 36443-53, 2006.

ZUO, J. *et al.* Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. **J. Neurosci.,** v. 18, n. 14, p. 5203-11, 1998.