MAÍRA DE ASSIS LIMA

Influência dos hormônios esteroidais na migração, invasão e expressão das proteases ADAMTS 1 e 4 em células derivadas de tumores de ovário.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

MAÍRA DE ASSIS LIMA

Influência dos hormônios esteroidais na migração, invasão e expressão das proteases ADAMTS1 e 4 em células derivadas de tumores de ovário.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Morais Freitas

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

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

Lima, Maíra de Assis.

Influência dos hormônios esteroidais sobre a migração, invasão e expressão de proteases ADAMTS 1 e 4 em células derivadas de câncer de ovário / Maíra de Assis Lima. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas.

Dissertação (Mestrado) – 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: Matriz Extracelular.

Versão do título para o inglês: Influence of steroid hormones in the migration, invasion and expression of ADAMTS 1 and 4 proteases in ovary cancer cells.

1. Metaloproteinase 2. Neoplasia 3. Matriz extracelular 4. Ovário I. Freitas, Profa. Dra. Vanessa Moraes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB046/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maíra de Assis Lima.

Título da Dissertação: Influência dos hormônios esteroidais sobre a migração, invasão e expressão de proteases ADAMTS 1 e 4 em células derivadas de câncer de ovário.

Orientador(a): Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 582/13 referente ao projeto intitulado: *“Influência de hormônios esteroidais nos níveis de expressão, localização e capacidade de invasão das ADAMTS-1,4 e 9 em células derivadas de tumores de ovário”* sob a responsabilidade de **Maíra de Assis Lima**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 27 de março de 2013.

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

PROF. DR. PAULO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e proteção infinita.

À professora Dr.^a Vanessa Moraes Freitas, pela orientação, confiança, dedicação e incentivos, pois com isso contribuiu de forma significativa durante todo o processo de elaboração do meu projeto e desta dissertação. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório e pela confiança que depositou em mim. Serei sempre grata pela sua orientação e pela oportunidade que me concedeu.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro. A concessão tanto do Projeto Jovem Pesquisador (2010/07699-1) quanto da bolsa de Mestrado (2013/01092-6) foram de extrema importância para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger e sua equipe, por toda atenção e disponibilidade dispensadas ao nosso grupo. Obrigado pelo espaço cedido em seu laboratório.

À professora Dr.^a Marilene Hohmuth, professora Dr.^a Nathalie Cella e professora Dr.^a Telma Maria Tenório Zorn e suas equipes. Agradeço pelo espaço cedido, equipamentos compartilhados, trocas de reagentes e conselhos sugeridos.

À professora Dr.^a Maria Inês Borella, professora Dr.^a Alison Colquhoun e Ana Iochabel Soares Moretti pela disponibilidade em participar do meu exame de qualificação e sugestões oferecidas.

Às secretárias, Elo e Ana. Em especial a Regina, por toda atenção, carinho e educação que sempre teve comigo.

Aos meus colegas de laboratório e amigos do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, em especial, Thaiomara, Suély, Adriane, Livia e Basílio

pelos ensinamentos, apoio técnico, amizade e pelas risadas. Vocês foram muito importantes para a conclusão do meu Mestrado.

Ao meu colega de laboratório, Iuri, pela realização do ensaio que avalia a velocidade celular durante o processo de migração das linhagens analisadas neste projeto.

Aos meus pais, Vilma e Lenilson, aos meus irmãos biológicos, Marina e Filipe, ao meu irmão de coração, Célio, e ao meu namorado, Levi, por sempre estarem ao meu lado e por me amarem de forma incondicional. Amo vocês.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

LIMA, M. A. **Influência dos hormônios esteroidais na migração, invasão e expressão de proteases ADAMTS 1 e 4 em células derivadas de tumores de ovário.** 2015. 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer de ovário é uma neoplasia ginecológica de difícil diagnóstico, pois devido à localização desses órgãos, a maioria das pacientes apresenta estágios avançados da doença quando diagnosticadas. Alternâncias hormonais, que estão associados com a menopausa, tais como uma diminuição nos níveis de estrogênio e de progesterona, e um consequente aumento do nível sistêmico dos hormônios gonadotróficos poderia ter um papel na manifestação da doença. Os hormônios sexuais modulam diversas atividades no câncer, influenciando desde o processo de tumorigênese, crescimento celular e metástase. As ADAMTS's (*adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ou *adamalysin-thrombospondin*) são proteases secretadas que estão envolvidas em funções como o processamento de colágeno em procolágeno N-proteinase, clivagem dos proteoglicanos da matriz e angiogênese. Nosso objetivo nesse trabalho foi avaliar se há Influência do estrogênio, progesterona e/ou testosterona nos níveis de expressão de mRNA, proteínas e distribuição das proteases ADAMTS1 e 4 e avaliar a capacidade destes hormônios em induzir a migração e invasão em células tumorais humanas de ovário. As linhagens NIH-OVCAR-3 e ES-2, derivadas de câncer de ovário humano, apresentam diferentes graus de malignidade. As linhagens foram tratadas com os hormônios progesterona, estrogênio ou testosterona e foram comparadas com a amostra controle, que não recebeu tratamento. Os níveis de mRNA foram avaliados por PCR em tempo real e os níveis proteicos foram analisados por *Immunoblot*, além de imunofluorescência para verificar a localização dessas proteases. A análise do mRNA demonstrou que o estrogênio e a testosterona induziram uma menor expressão gênica das proteases ADAMTS1 e 4 em relação ao controle para a linhagem ES-2, houve o aumento do mRNA de ADAMTS 1 e 4 com o tratamento com a progesterona. Já para na linhagem NIH-OVCAR-3 não houve diferenças estatisticamente significantes para a expressão de mRNA. Na análise da proteína, a progesterona foi capaz de induzir aumento nos níveis proteicos de ADAMTS1 e 4 no lisado das linhagem NIH-OVCAR-3 e ES-2. Além disso, a progesterona diminuiu a atividade migratória da linhagem NIH-OVCAR-3 e a capacidade migratória e de invasão da linhagem ES-2. Através de imunofluorescência observamos a presença pontual de ADAMTS1 no núcleo das células, enquanto que a protease ADAMTS4 mostrou-se dispersa por todo o núcleo e citoplasma. Desta maneira, concluímos que a progesterona regula a expressão das ADAMTS 1 e 4, além de reduzir a invasão e migração de células derivadas de câncer de ovário.

Palavras-chave - Câncer de ovário. Matriz extracelular. Metaloproteinases da matriz. ADAMTS1 e 4. Hormônios.

ABSTRACT

LIMA, M. A. **Influence of steroid hormones in the migration, invasion and expression of ADAMTS1 and 4 proteases in ovary cancer cells.** 116 p. Master Thesis (Cellular and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Ovarian carcinoma is the leading cause of gynecological neoplastic death, being associated primarily with deregulation of sex hormones. Sex hormones influence tumorigenesis, cell growth and metastasis. ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs or *adamatysin-thrombospondin*) are secreted proteases involved in collagen processing, cleavage of the proteoglycan matrix and angiogenesis. Our aim is to assess whether sex hormones would affect ADAMTS1 and 4 expressions in ovarian cancer cells. We analyzed mRNA and protein levels in human ovarian tumor cells with different degrees of malignancy, NIH-OVCAR-3 and ES-2. The mRNA analysis showed that estrogen and testosterone induced a decrease on gene expression of ADAMTS proteases 1 and 4 compared to the control for the ES-2 cell line, while progesterone led to an increase in the mRNA levels of these same proteases. For the NIH-OVACR-3 cell line there were no statistically significant differences in mRNA expression. Progesterone increases ADAMTS's protein levels in the lysate and in conditioned medium from NIH-OVCAR-3 and in the lysate from ES-2 cells. Immunofluorescence showed ADAMTS 1 located at the cell nucleus, as punctate accumulation in the nucleolus. ADAMTS4 presented a more diffuse staining pattern appearing dispersed in cytoplasm and nucleus in both cell lines. NIH-OVCAR-3 cells treated with progesterone exhibited decrease migratory activity compared to control and ES-2 exhibited decrease invasion activity. We conclude that progesterone modulates ADAMTS1 and 4 levels in ovarian cancer cell lines and decrease migratory and invasion behavior in ovarian cancer cells.

Keywords - Ovarian cancer. Extracellular matrix. Matrix metalloproteinases. ADAMTS1 and 4. Hormones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Capacidades adquiridas pelas células cancerosas.	21
Figura 2 - Desenho esquemático de ovário de uma mulher em idade reprodutiva.....	24
Figura 3 - Mecanismos de função da MEC.....	30
Figura 4 - Estrutura esquemática das MMPs nas formas inativa e ativa. .	35
Figura 5 - Estrutura das proteinases ADAM e ADAMTS.	34
Figura 6 - Domínios estruturais e análise filogenética dos membros da família ADAMTS.....	37
Figura 7 - Flutuação dos níveis hormonais durante os ciclos fisiológicos femininos..	43
Figura 8 - Imagens representativas das linhagens celulares de câncer de ovário ES-2 e NIH-OVCAR-3.	52
Figura 9 - Representação esquemática do ensaio de invasão.....	58
Figura 10 - Proteases ADAMTS 1 e 4 presentes no lisado das células NIH-OVCAR-3 e ES-2.	64
Figura 11 - Proteases ADAMTS 1 e 4 secretadas pelas células NIH-OVCAR-3 e ES-2.	65
Figura 12 - Viabilidade das células NIH-OVCAR-3 e ES-2 na presença dos hormônios.....	70
Figura 13 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona na expressão gênica de ADAMTS 1 e 4 nas linhagens NIH-OVCAR-3 e ES-2	69

Figura 14 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem NIH-OVCAR-3..	71
Figura 15 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona na expressão das ADAMTS 1 e 4 secretadas pela linhagem NIH-OVCAR-3.	72
Figura 16 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem ES-2.....	74
Figura 17 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 secretadas pela linhagem ES-2..	75
Figura 18 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem NIH-OVCAR-3..	80
Figura 19 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no meio condicionado da linhagem NIH-OVCAR-3.....	78
Figura 20 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem ES-2.....	80
Figura 21 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no meio condicionado da linhagem ES-2..	81
Figura 22 - Imunolocalização de ADAMTS 1 e 4 nas linhagens celulares NIH-OVCAR-3 e ES-2..	83
Figura 23 - Progesterona diminui a migração e invasão da linhagem NIH-OVCAR-3 e ES-2, respectivamente.	85
Figura 24 - Análise da migração da linhagem NIH-OVCAR-3 pelo ensaio de ferida..	86
Figura 25 - Análise da migração da linhagem ES-2 pelo ensaio de ferida.5.	90

Figura 26 - Síntese dos resultados obtidos.	88
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 para o sexo feminino.....	27
---	-----------

Tabela 2 - Classificação de acordo com os substratos das MMPs.....	31
---	-----------

Tabela 3 - Classificação de acordo com os substratos das ADAMTSs.....	38
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM	do inglês “a disintegrin and metalloproteinase”, traduzido como uma desintegrina e metaloproteinase
ADAMTS	do inglês “a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif”, traduzido como uma desintegrina e metaloproteinase com domínio trombospondina
AR	receptor de andrógeno
BRCA1/2	do inglês “breast cancer 1/2”
CCC	carcinoma de células claras
cDNA	do inglês “complementary deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucleico complementar
CD36	do inglês “cluster of differentiation 36”
CD44	do inglês “cluster of differentiation 44”
Ct	do inglês “cycle threshold”, ciclo no qual a fluorescência atinge o limiar de detecção
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHT	di hidrotестosterona
DMEM	do inglês “Dulbecco’s Modified Eagles Medium”, traduzido como meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	di-metilsulfóxido
DNA	do inglês “deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucleico
E2	estrógeno
EGF	fator de crescimento epidermal
ER	receptor de estrógeno

FSH	hormônio folículo-estimulante
GAPDH	do inglês “glyceraldehyde-3-phosphato dehydrogenase”, traduzido como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
hCG	gonadotrofina coriônica humana
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IgG	imunoglobulina G
LH	hormônio luteinizante
MEC	matriz extracelular
MMP	do inglês “matrix metalloproteinases”, traduzido como metaloproteinases da matriz
m-PR	receptor de membrana para a progesterona
mRNA	RNA mensageiro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
n-PR	receptor nuclear de progesterona
P4	progesterona
PBS	do inglês “phosphate-buffered saline”, traduzido como tampão fosfato salina
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”, traduzido como Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
PR	receptor de progesterona
qPCR	do inglês “quantitative Polymerase Chain Reaction”, traduzido com reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	do inglês “ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio

SFB	soro fetal bovino
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
TIMP	do inglês “tissue inhibitors of metalloproteinases”, traduzido como inibidor tecidual de metaloproteinase
TSR	domínio trombospondina repetido
UV	ultravioleta
VEGF	do inglês “vascular endothelial growth fator”, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
Δ	delta
Ca	Cálcio
cm ²	centímetros quadrados
CO ₂	gás carbônico
g	força centrífuga relativa
kDa	kilodalton
ml	mililitro
mM	milimolar
nM	nanomolar
pH	potencial hidrogeniônico
Zn	Zinco
α	alfa
β	beta
ml	mililitro
μ l	microlitro
μ M	micromolar
M	molar, medida de concentração de soluções
mg	miligramas
mg/ml	miligramas por mililitro
mm ²	milímetros cúbicos

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Câncer.....	20
1.2	Ovários e o câncer de ovário	23
1.3	Matriz extracelular e o microambiente tumoral.....	27
1.4	Metaloproteinases de Matriz (MMPs).....	31
1.5	ADAMs e ADAMTSs	33
1.6	ADAMTS 1 e 4	38
1.7	Hormônios sexuais.....	42
1.8	Progesterona.....	44
1.9	Estrógeno.....	45
1.10	Testosterona	46
1.11	Modelo utilizado	47
2	OBJETIVOS	49
2.1	Objetivos Gerais.....	50
2.2	Objetivos específicos	50
3	MATERIAS E MÉTODOS.....	51
3.1	Linhagens celulares	52
3.2	Tratamentos das linhagens celulares com hormônios	53
3.3	MTT	53

3.4	PCR em tempo real.....	54
3.5	Immunoblot	55
3.6	Imunofluorescência indireta	57
3.7	Ensaio de invasão.....	58
3.8	Ensaio de migração.....	59
3.9	Ensaio de ferida	60
4	RESULTADOS	62
4.1	Comparação dos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 nas linhagens celulares NIH-OVCAR-3 e ES-2.....	63
4.2	Efeito dos hormônios sexuais na proliferação celular	66
4.3	Efeito dos hormônios sexuais nos níveis de mRNA de ADAMTS 1 e 4 ...	68
4.4	Efeito dos hormônios sexuais nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4	70
4.5	Efeitos da utilização do antagonista do receptor de progesterona, RU486 (Mifepristone) sobre a expressão proteica de ADAMTS 1 e 4.....	76
4.6	Efeitos dos hormônios sexuais na localização de ADAMTS 1 e 4	82
4.7	Efeitos da progesterona sobre a migração e invasão	84
4.8	Síntese dos resultados obtidos	88
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. A incidência do câncer está aumentando nos países em desenvolvimento econômico, como resultado do envelhecimento da população e a adoção de estilos de vida associados com o desenvolvimento do câncer, incluindo tabagismo, falta de atividade física e dietas não balanceadas (JEMAL et al., 2011). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, também válida para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - (INCA), 2014).

O câncer é uma doença multifacetada caracterizada por alterações genéticas heterogêneas (GERDES et al., 2014). Células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, ao adquirirem uma sucessão de capacidades que lhes permitam evoluir para um fenótipo maligno. Porém, a biologia dos tumores não se define simplesmente pelas diversas características que as células cancerosas adquirem, mas também abrange contribuições do microambiente tumoral para o processo de tumorigênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Até o momento, seis características principais mostraram estar envolvidas com o desenvolvimento do câncer: autossuficiência de sinais de crescimento; insensibilidade a sinais inibidores de crescimento; aumento do potencial de replicação; evasão à apoptose; sustentação da angiogênese; invasão tecidual e metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

Figura 1 - Capacidades adquiridas pelas células cancerosas. Através de diversos mecanismos, a maioria dos cânceres adquire o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento. Adaptado de (HANAHAHAN E WEINBERG, 2011).

Nenhuma célula normal possui a capacidade de proliferar na ausência de sinais estimuladores de crescimento. As células neoplásicas tornam-se independentes desta estimulação de crescimento exógena com a produção de fatores de crescimento os quais irão agir sobre seus receptores, gerando um estímulo proliferativo autócrino (CHENG et al., 2008), hiperexpressão de receptores em sua superfície (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011) ou através do envio de sinais as células normais que respondem às células tumorais fornecendo-as fatores de crescimento (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004). Para a proliferação contínua das células cancerígenas é igualmente necessário que elas evitem a ação dos inibidores de crescimento celular, os quais são essenciais para a homeostasia celular em tecidos normais. Defeitos nestes mecanismos de controle do crescimento celular por feedback negativo permitem aumentar a sinalização da proliferação (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

As células dos mamíferos possuem um programa intrínseco que limita o seu potencial replicativo. O aparato molecular que limita o número de divisões está relacionado com segmentos de DNA nas extremidades dos cromossomos conhecidos como telômeros. Para a progressão tumoral é fundamental que a célula possua potencial replicativo ilimitado. Células malignas mostraram expressão de telomerase, o qual adiciona repetições de hexanucleotídeos aos locais terminais do DNA telomérico, evitando o encurtamento dos telômeros após cada ciclo celular, estabilizando o genoma mutante e conferindo a capacidade ilimitada de replicação (RAYNAUD et al., 2010).

A capacidade de uma população de células neoplásicas expandir em número não depende só da taxa de proliferação celular, mas também da taxa de morte celular (ou apoptose). A apoptose trata-se de uma morte programada e ativa, que requer energia, síntese e degradação proteica (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980). Através dela, os organismos vivos eliminam as células potencialmente prejudiciais, para a manutenção da homeostase (Hengartner, 2000). A resistência a apoptose pelas células neoplásicas pode ser adquirida por vários mecanismos, no entanto, o mais comum consiste em mutações no gene supressor tumoral p53, um gene chave na manutenção da integridade do DNA e na indução da cascata apoptótica (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HARRIS, 1996).

Para que uma população de células consiga se estabelecer e sobreviva no tecido, elas necessitam fundamentalmente do oxigênio e de nutrientes fornecidos pelos vasos sanguíneos (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011), desta maneira a angiogênese é fundamental para a formação do tumor. Durante a tumorigênese o equilíbrio adequado entre moléculas proangiogênicas e antiangiogênicas e a estimulação por fatores de crescimento parácrinos e autócrinos é perdida (MUELLER; FUSENIG, 2004). O mecanismo principal para a angiogênese, conhecido como a germinação endotelial, depende do aumento na regulação do fator de crescimento endotelial vascular e do desenvolvimento de interações entre as células endoteliais, pericitos,

células estromais, e a associação com a matriz extracelular (MEC) (GORDON; MENDELSON; KATO, 2010).

A capacidade de invadir e gerar metástases permite às células neoplásicas escaparem ao tumor primário e colonizarem novos locais do organismo. Na transição do carcinoma in situ para carcinoma invasivo há o rompimento da membrana basal, pela proliferação de células neoplásicas que possuem elevada capacidade proteolítica. Assim, a travessia das células neoplásicas pelas barreiras da membrana basal é resultado da síntese de proteínas ativas e a aquisição de um fenótipo invasivo (CHRISTOFORI, 2006). Várias classes de proteínas estão alteradas nas células com capacidade de invadir e metastizar, entre as quais as proteínas de adesão célula-célula, como as caderinas, as proteínas que ligam as células a substratos da matriz extracelular, como as integrinas (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004) e proteínas secretadas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (MERDAD et al., 2014).

1.2 Ovários e o câncer de ovário

As glândulas de produção dos hormônios femininos são os ovários. As mulheres têm dois ovários, um de cada lado da pelve em contato com o útero através das trompas. Sua função é produzir o estrogênio e a progesterona que entre outras coisas, regem o ciclo menstrual da mulher, e produzir e armazenar os ovócitos. Os ovócitos são liberados dos ovários a cada ciclo menstrual normal e se encaminham para o útero pelas trompas. O óvulo se fixa na parede interna do útero e se desenvolve num feto depois de fertilizado pelo espermatozóide.

Os ovários na sua camada mais externa são revestidos por epitélio cúbico simples, o qual é sustentado por uma camada de tecido conjuntivo denso denominado de túnica albugínea. Os gametas femininos ou ovócitos localizam-se no interior dos folículos ovarianos que estão presentes na região cortical do ovário. A parte mais interna do ovário é a região medular, formada por tecido conjuntivo frouxo com um rico leito vascular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais). A função do folículo é proporcionar um ambiente ideal para a manutenção da viabilidade, crescimento e maturação do oócito (PICTON et al., 2008).

Figura 2 - Desenho esquemático de ovário de uma mulher em idade reprodutiva. No desenho são esquematizados os principais componentes do ovário: epitélio germinativo, túnica albugínea, região cortical e região medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Todos diferentes tipos de células que compõem os ovários podem dar origem a tumores benignos ou malignos. Devido à localização desses órgãos mais de 70% das mulheres apresentam a doença na forma avançada quando diagnosticadas, e mesmo com tratamento, a taxa de sobrevida em cinco anos das pacientes com carcinoma de ovário é apenas de 30-50%. Este prognóstico pobre é resultado do diagnóstico tardio e da terapia ineficaz para a doença em estágio avançado (WEEN; OEHLER; RICCIARDELLI, 2011), tornando este carcinoma a principal causa de morte neoplásica ginecológica (SAPOZNIK et al., 2009).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer no ano de 2014 houve 5.680 novos casos de câncer de ovário no Brasil (Inca, 2014). A maioria dos tumores de ovário tem origem epitelial (mais de 80%); 10 a 15% são tumores de células germinativas e 5 a 10%, tumores do estroma. Entre os tumores epiteliais, 40% são do tipo seroso, seguidos pelos tumores mucinosos, endometrioides, de células claras e mistos (CHEN et al., 2003).

Os fatores de risco mais comuns associados ao câncer de ovário são: idade, história familiar e a reposição hormonal (GATES et al., 2010; RISTOW; YAMAMOTO; FAVARO, 2006).

O câncer de ovário é raro em mulheres com idade abaixo dos 40 anos, sendo que o risco é aumentado após esta idade, com maiores incidências entre 65 e 79 anos (ADAMI; HUNTER; TRICHOUPoulos, 2008).

O câncer de ovário pode estar relacionado ao histórico familiar de carcinoma da mama, ovário ou ambos e nessas pacientes pode incidir em idade mais precoce do que em população geral. Essa síndrome familiar está relacionada à mutação, principalmente, em dois genes, o BRCA-1 e BRCA-2, envolvidos no processo de reparo de DNA (CANNISTRA, 2004).

Estudos mostram que o tratamento de reposição hormonal, tanto o com a utilização somente de estrogênio, como o uso combinado deste com progestina, aumenta o risco em desenvolver câncer de ovário (PEARCE et al., 2009).

Alguns fatores estão relacionados com uma menor incidência do câncer de ovário, como gestação, amamentação, o uso de contraceptivos orais ou ter realizado ligadura tubária ou histerectomia (RICCI et al., 2008).

Concomitante à gestação ocorrem anovulação e supressão pituitária e, logo, há diminuição no risco carcinogênico sobre epitélio ovariano. Assim, teoricamente, cada gestação adicional está associada com diminuição de risco de carcinoma de ovário (JEPPSSON; RANNEVIK; THORELL, 1977; SCHOCKET al., 2014). Torna-se difícil avaliar o fator protetor da amamentação isoladamente, uma vez que está relacionada à gestação. Assim, muitos estudos são favoráveis ao seu papel protetor (CHIAFFARINO et al., 2005; RIMAN et al., 2002; TUNGET al., 2003).

Contraceptivos hormonais são um fator de proteção estabelecido para o câncer de ovário. Uma reanálise de 45 estudos distintos realizados em 21 países mostrou que quanto mais tempo uma mulher usa anticoncepcionais hormonais, menor o risco de se desenvolver esta neoplasia (BERAL et al., 2008).

Ligação tubária e histerectomia, com conservação de ovários, podem comprometer o suplemento sanguíneo ovariano. Com isso, as sequelas cirúrgicas desses procedimentos, inclusive as circulatórias, agem diminuindo a ação hormonal e, assim, reduzem o risco de câncer de ovário em torno de 80% (RIMAN; NILSSON; PERSSON, 2004).

O quadro clínico é inespecífico sendo que o primeiro sintoma pode ser um leve desconforto na região abdominal inferior. Pode ocorrer acúmulo de líquido no interior da cavidade abdominal, causando inchaço em todo abdômen. Raramente existe sangramento uterino e em estágios avançados pode ocorrer distensão abdominal em decorrência do aumento dos ovários e do acúmulo de líquido (LUIZ et al., 2009).

Diversas modalidades terapêuticas podem ser oferecidas (cirurgia, radioterapia e quimioterapia). A escolha vai depender principalmente do tipo histológico do tumor, do estadiamento clínico e/ou cirúrgico do tumor, da idade

e das condições clínicas da paciente e se o tumor é inicial ou recorrente (RISTOW; YAMAMOTO; FAVARO, 2006).

	Localização primária	casos novos	%
Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 para o sexo feminino. O câncer de ovário aparece entre os principais tipos de câncer que atingem as mulheres. Adaptado de (INCA, 2014).

1.3 Matriz extracelular e o microambiente tumoral

A MEC é um componente essencial dos tecidos, que constitui os organismos multicelulares. A MEC é composta por glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas e água, as quais dão origem a porção fibrilar e à substância fundamental da matriz (BERRIER; YAMADA, 2007). Essas macromoléculas interagem entre si formando uma estrutura tri-dimensional e estão ligadas às células por receptores na superfície da membrana, denominados integrinas. Estruturalmente, estes componentes formam tanto a membrana basal, que é produzido conjuntamente pelas células epiteliais e endoteliais e células do estroma, para separar epitélio ou endotélio do estroma, e uma matriz intersticial, que é feito principalmente por células do estroma (LU; WEAVER; WERB, 2012). Esta organização não é estática, a composição da MEC varia em função do estado diferenciado do tecido e em função da idade. Ela muda durante o desenvolvimento, maturidade, patologias e envelhecimento, logo a organização da MEC é um processo dinâmico (LABAT-

ROBERT, 2012). A MEC circunda as células em todos os tecidos, propiciando suporte estrutural e definindo as características de forma e função dos tecidos (COX; ERLER, 2011). As proteínas da MEC estão envolvidas na interação célula-célula, controlando a arquitetura tissular, orquestrando a adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação celular, estando envolvidas também com a resposta inflamatória, cicatrização, homeostase dos tecidos e órgãos e apresenta um papel central no desenvolvimento embrionário (PARAMESWARAN et al., 2006).

Figura 3 - Mecanismos de função da MEC. Mecanismos de função da MEC. Ancoragem à membrana basal (fase 1). Bloqueia e facilita a migração de células (estágios 2 e 3). Reservatório de moléculas (etapa 4). Co-receptor de sinal (etapa 5) ou um apresentador de sinal (etapa 6). Liberação de fragmentos bioativos (fase 7). Alterações no comportamento celular devido a modificações nos componentes da MEC (fase 8). Adaptado de (LU; WEAVER; WERB, 2012).

As funções versáteis da MEC dependem de suas diversas propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas. A ancoragem à membrana basal é essencial para vários processos biológicos, incluindo a divisão celular

assimétrica, na biologia das células precursoras, e manutenção da polaridade do tecido. Dependendo do contexto a MEC pode servir para bloquear ou facilitar a migração de células. Além disso, a MEC pode se ligar as moléculas de sinalização impedindo a sua difusão livre, atuando como um dissipador para estes sinais e ajudando a formar gradientes de concentração. Alguns componentes da MEC, incluindo proteoglicanos de sulfato de heparan e o receptor para o ácido hialurônico, CD44, podem se ligar seletivamente a diferentes fatores de crescimento funcionando como co-receptores e apresentadores de sinal. A MEC também emite sinais diretos para as células, liberando fragmentos bioativos, os quais foram processados por proteases tais como as MMPs. Finalmente, as células sentem diretamente as propriedades biomecânicas da MEC, incluindo a sua rigidez, o que desencadeia uma grande variedade de comportamentos nas células (LU; WEAVER; WERB, 2012).

As funções desempenhadas pela MEC ovariana estão intimamente relacionadas com a sua diversidade de compartimentos e componentes. Dentre os principais compartimentos, têm a lâmina basal folicular, o fluido folicular, a zona pelúcida e o estroma ovariano. Em cada um deles, existem diferentes componentes encontrados de maneira difusa pelo tecido ovariano, como a fibronectina, colágeno, ácido hialurônico, versican (RODGERS; IRVING-RODGERS; VAN WEZEL, 2000) e proteases como ADAMTS's (*adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ou *adamalysin-thrombospondin*) (SHOZU et al., 2005). A MEC ovariana é importante para a sobrevivência e proliferação das células da granulosa durante a foliculogênese. In vitro, vários estudos têm demonstrado que a presença de componentes da MEC como o colágeno tipo IV, laminina e fibronectina melhoram a proliferação de células da granulosa, aumenta o número de folículos primordiais que entram na fase de crescimento, bem como influenciam a ação dos fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento folicular (WOODRUFF; SHEA, 2007). Proteases que compõem a MEC, como proteases da família ADAMTS já mostraram ser fundamentais para o processo de foliculogênese, além de desempenhar papel na formação de novos vasos linfáticos no estroma ovariano (BROWN et al., 2006; SHOZU et al., 2005).

Já em relação ao seu papel no câncer, estudos genéticos e de biologia celular indicam que o crescimento tumoral de diferentes tipos de carcinoma, dentre eles o câncer de ovário, não é apenas determinado pelo crescimento das células malignas, mas também pelo estroma tumoral (KALLURI, 2003; LILI et al., 2013). O microambiente tumoral é reconhecido por ser produto da interação entre diferentes tipos celulares. Elementos estromais, incluindo fibroblastos associados ao câncer propiciam uma rede de comunicação essencial, via secreção de fatores de crescimento e quimiocinas, induzindo alterações na MEC, proporcionando assim sinais oncogênicos adicionais que aumentam a vascularização, proliferação e invasão tumoral (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Alterações na dinâmica da MEC já foram descritos em diversas doenças e são uma marca registrada no desenvolvimento do câncer. Por exemplo, o excesso ou a diminuição na produção dos componentes da MEC são proeminentes na fibrose do tecido de muitos órgãos (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010) e vários colágenos, incluindo colágeno I, II, III, V e IX, mostraram aumento na deposição durante a formação do tumor (HUIJBERS et al., 2010; KAUPPILA et al., 1998). Além disso, outros componentes da MEC e seus receptores, como proteoglicanos de sulfato de heparan e CD44, que facilitam a sinalização de fatores de crescimento, frequentemente são produzidas em excesso no câncer (NASSER, 2008).

No câncer de ovário alterações nos componentes da MEC mostraram estar relacionados com características mais malignas das células neoplásicas. Níveis elevados de laminina- γ 2, colágenos tipos I e III, fibronectina, sindecam-1, glipicano-1, versican, e ácido hialurônico e seus receptores CD44 têm sido associados a um mau prognóstico para o câncer de ovário (JANUCHOWSKI et al., 2014; RICCIARDELLI; RODGERS, 2006; SALANI et al., 2007). As metaloproteinases, presentes nesse estroma, que degradam a matriz extracelular, são essenciais para a progressão tumoral e processo metastático (ROCKS et al., 2008). Já foi visto que os passos iniciais para que as células de câncer de ovário sofram metástase ocorre através da clivagem de vitronectina e fibronectina mediada pela metaloproteinase de matriz MMP-2 (KENNY et al., 2008).

1.4 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As MMPs são uma família de mais de 20 subtipos de proteases zinco e cálcio-dependentes, estruturalmente relacionadas. Elas são caracterizadas pela habilidade de degradarem componentes da matriz extracelular, como o colágeno, fibronectina e vários proteoglicanos (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; VISSE; NAGASE, 2003).

Fisiologicamente as MMPs participam das etapas de proliferação celular, diferenciação, remodelamento da matriz extracelular, vascularização, migração celular (CHANG; WERB, 2001), regulação de processos inflamatórios e em doenças como o câncer (GRASSO; BONNET, 2014).

Estas proteínas podem ser classificadas levando em consideração critérios como os mecanismos que desencadeiam uma reação catalítica, substrato de preferência, produtos resultantes e homologia estrutural (PRZEMYSŁAW et al., 2013).

Classificação	Metaloproteinase
Colagenases	MMP 1, MMP 8, MMP 13 e MMP 18
Gelatinases	MMP 2 e MMP 9
Estromelisinases	MMP 3 e MMP 10
Matrilisinases	MMP 7 e MMP 26
MMPs do tipo membrana	MT1-MMP a MT8-MMP
Metaloelestatases	MMP 12

Tabela 2 - Classificação de acordo com os substratos das MMPs.

Independente do substrato que degradam, as MMPs apresentam algumas similaridades estruturais. De um modo geral, elas constituem-se de um peptídeo sinal, um pró-domínio auto inibitório (domínio pró-peptídico), um

domínio catalítico e um domínio hemopexina. Estas são secretadas na forma de precursores inativos (zimogênios) cuja latência é mantida através da interação entre o resíduo de cisteína, que está presente no pró-domínio, e o zinco presente no domínio catalítico, o que impede o acesso ao sítio ativo pelo substrato. Elas podem ser ativadas por outras MMPs, por outras classes de proteases, ou por meio da ação não proteolítica como o estresse oxidativo e detergentes. Estes promovem a clivagem do domínio pró-peptídicos, deixando o sítio catalítico da enzima livre para interação com o respectivo substrato (RA; PARKS, 2007; ROZANOV et al., 2004;). As MMPs regulam uma variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização e também desempenham importante função em processos patológicos, como na comunicação molecular entre o tumor e o estroma (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Portanto, é necessário que haja um controle rígido das atividades das proteases, para evitar danos teciduais indesejáveis. Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são inibidores endógenos das MMPs e promovem o controle da atividade dessas formando um complexo na proporção de 1:1 com o zinco do domínio catalítico, promovendo, assim, um impedimento estérico dessas com os seus substratos (RAFFETTO et al., 2008). O equilíbrio tecidual entre MMPs e TIMPs é primordial para a dinâmica da degradação da matriz extracelular, sendo fundamental para a manutenção da homeostase tecidual, progressão do câncer e metástase (DEVY et al., 2002; HUA et al., 2011).

Figura 4 - Estrutura esquemática das MMPs nas formas inativa e ativa. Adaptado de (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

1.5 ADAMs e ADAMTSs

As ADAMs (adisintegrin and metalloproteinase) são glicoproteínas transmembranares caracterizadas pela presença de múltiplos domínios funcionais em sua estrutura. As ADAMs exercem papel fundamental na regulação do fenótipo celular, modulando interação célula-célula, a adesão à matriz extracelular, o processamento proteolítico de diversas moléculas de superfície e a sinalização intra e intercelular (PRIMAKOFF; MYLES, 2000). As ADAMs são caracterizadas por seus domínios estruturais conservados, consistindo de um sinal de sequência N-terminal, seguido por um pró-domínio, um domínio metaloproteinase, um domínio desintegrina com a região rica em cisteína, um domínio EGF (fator de crescimento epidermal), um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática. A modulação da atividade das ADAMs ocorre, assim como nas MMPs, pela remoção do pró-domínio e mudança da sua distribuição intracelular (REISS; SAFTIG, 2009). A natureza fundamental dos processos biológicos controlados pelas ADAMs, indicam que a desregulação dessas enzimas podem contribuir para mecanismos patológicos. Elas têm sido relacionadas com o câncer, doenças neurológicas, cardiovasculares, infecção e inflamação (CHRISTIAN, 2012; EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008). Como metaloproteinases

ativas, as ADAMs podem ter influência na promoção da invasão tumoral e metástase, via clivagem de proteínas presentes na MEC. As ADAMs podem diretamente modular a adesão celular em tumores, por interações com integrinas e proteoglicanos (ARRIBAS; BECH-SERRA; SANTIAGO-JOSEFAT, 2006).

As ADAMTSs (adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs ou adamalysin-thrombospondin) são enzimas semelhantes às MMPs, dependentes de Zn^{2+}/Ca^{2+} (PORTER et al., 2005) secretadas e que estão envolvidas em diversas funções - processamento de colágeno, clivagem dos proteoglicanos da matriz (versican, aggrecan e brevican), angiogênese (STANTON et al., 2011; VÁZQUEZ et al., 1999), clivagem da protease do fator de Von Willebrand para a homeostase da coagulação sanguínea, inflamação (Kuno et al., 1997; Apte, 2009), organogênese, fertilidade (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008), estrutura do tecido conjuntivo e câncer (LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011).

Figura 5 - Estrutura das proteinases ADAM e ADAMTS. Adaptado (ROCKS et al., 2008).

As ADAMTS estão intimamente relacionadas com as proteinases ADAM (Desintegrinas e Metaloproteases) que participam na clivagem do ectodomínio ou na ativação de diversas moléculas da superfície celular, incluindo receptores

de fatores de crescimento e moléculas de adesão. Contudo, ao contrário das ADAM que, com exceções pontuais, são proteínas transmembranares, as ADAMTS são proteínas de secreção, algumas das quais se ligam à matriz extracelular (ECM) (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Após a publicação do primeiro membro da família, ADAMTS 1, em 1997 (KUNO et al., 1997), o sequenciamento completa do genoma humano revelou 19 membros desta família de proteases. Todas as enzimas ADAMTS compartilham de uma estrutura em comum que compreende, a partir do domínio N-terminal, um péptido sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, um domínio semelhante a desintegrina, um domínio trombospondina repetido (TSR) na região central, um domínio rico em cisteína e um domínio espaçador. Com a exceção de ADAMTS 4, todas as outras enzimas ADAMTS tem um domínio TSR na região C-terminal, e alguns membros da família possuem exclusivos módulos adicionais também na porção C-terminal (TORTORELLA et al., 2009).

O pró-domínio é responsável por manter as ADAMTS em latência, ou seja, essas proteínas necessitam de enzimas para torna-lás ativas. Pró-proteínas convertases, como a furina, irão cliva-lás em sítios específicos para que então possam efetuar sua atividade catalítica. Além disso, o pró-domínio mantém a correta conformação das ADAMTS para a sua secreção (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

O domínio catalítico possui a sequência de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH), que é coordenado por três resíduos de histidina (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

O domínio semelhante à desintegrina, corresponde a um domínio pequeno constituído por 60 a 90 aminoácidos com 25 a 45% de similaridade com as desintegrinas do veneno de cobra, no entanto sem o seu arranjo de cisteína canônico (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008). As desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária. Algumas desintegrinas possuem a sequência adesiva RGD através da qual se ligam ao receptor de

fibrinogênio, o que resulta na inibição da agregação plaquetária dependente de fibrinogênio (NIEWIAROWSKI et al., 1994).

O TSR central é muito semelhante em todas as ADAMTS e compreende entre 48 a 54 aminoácidos (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008). Além disso, já foi observado que TSR central possui atividade antiangiogênica e antitumoral (LIU; XU; YU, 2006).

O Domínio rico em cisteína constitui uma sequência bem conservada entre as ADAMTS, contendo 10 resíduos de cisteína. Pode estar associado à adesão e migração das células, uma vez que interage com proteoglicanos de membrana, como o sindecan, envolvido na interação célula-matriz (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

O domínio espaçador apresenta pouca homologia entre as ADAMTS. Pode ser dividido numa metade N-terminal em que vários aminoácidos hidrofóbicos são conservados e em uma metade C-terminal variável (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008). Juntamente com o domínio rico em cisteína, o domínio espaçador, determina o reconhecimento e ligação da protease aos substratos e sua localização na MEC (GENDRON et al., 2007; FUSHIMI et al., 2008).

Os TSRs C-terminal possuem uma sequência muito mais variável que o TSR central. Alguns TSR em determinadas ADAMTS podem ainda conter um motivo BBXB que liga a heparina ou um motivo CVSTCG que liga o receptor de superfície celular CD36 (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

Quatro tipos de módulos C-terminal foram encontrados. As ADAMTS 9 e 20 possuem um módulo encontrado somente no seu ortólogo GON-1 que contém 10 cisteínas conservadas e vários outros aminoácidos conservados. ADAMTS 2, 3, 10, 14 17 e 19 contêm um domínio PLAC, que é encontrado em algumas convertases pró-proteína. Finalmente ADAMTS 13 é o único membro desta família que contém domínios CUB, existindo dois localizados na sua região C-terminal (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

Figura 6 - Domínios estruturais e análise filogenética dos membros da família ADAMTS.

As ADAMTS agrupam-se em pequenas classes e estão organizadas de acordo com sua estrutura molecular, sequência proteica, estrutura do gene e preferência por determinados substratos (ROCKS et al., 2008). A família ADAMTS é geralmente subdividida em 4 classes, baseada nas similaridades estruturais e/ou funcionais: proteoglicanases (ADAMTS 1, 4, 5, 8, 15 e 20), pró-colagenases-n-peptidases (ADAMTS 2, 3 e 14), clivagem do fator de Von Willebrand (ADAMTS 13), degradação da proteína oligomérica da matriz da cartilagem (ADAMTS 7 e 12) e aquelas proteases que as funções permanecem indefinidas (ADAMTS 6, 16, 17, 18 e 19) (APTE, 2009; PORTER et al., 2005).

Substratos	Proteases
Agregam	ADAMTS 1, 4, 5, 9 e 15
Versicam	ADAMTS 1, 4 e 9
Brevicam	ADAMTS 4
Pró- colágeno	ADAMTS 2, 3 e 14
Fator de Von Willebrand	ADAMTS 13
Proteína oligomérica da matriz da cartilagem	ADAMTS 7 e 20
Desconhecido	ADAMTS 6, 16, 17, 18 e 19

Tabela 3 - Classificação de acordo com os substratos das ADAMTSs.

Em relação à regulação, existem evidências que várias ADAMTS são reguladas por fatores de crescimento, hormônios e citocinas inflamatórias. Entre estas moléculas reguladoras encontram-se o TGF- α (WANG et al., 2003), hormônios tireoidianos, nomeadamente a tri-iodotironina (T3) (MAKIHIRA et al., 2003), paratormônio (MILES et al., 2000), hormônio luteinizante, hormônio gonadotrófico coriônico humano e progesterona (ROBKER et al., 2000). Regulando negativamente, as TIMP, inibidores efetivos das metaloproteinases, inibem também as ADAMTS, no entanto, de uma forma mais seletiva (HASHIMOTO et al., 2003).

1.6 ADAMTS 1 e 4

Fisiologicamente ADAMTS 1 foi inicialmente descrita como um mediador da inflamação (KUNO et al., 1997), entretanto já foi demonstrado que esta protease é necessária para o crescimento normal, além de auxiliar na estrutura e no funcionamento dos rins, da glândula adrenal e do aparelho reprodutor feminino (SHINDO et al., 2000), participando da foliculogênese ovariana, na formação de vasos sanguíneos e linfáticos (BROWN et al., 2006) e do processo de ovulação (BROWN et al., 2010).

No ovário, durante o processo de ovulação induzido pelo hormônio luteinizante (LH), a libertação de um ovócito maduro com células do cumulus circundante através do epitélio superficial exige a remodelação da matriz extracelular ovariana (BROWN et al., 2010; NAGASE; WOESSNER, 1999). Estudos mostram que ADAMTS 1 é fundamental para a morfogênese estrutural dos folículos e do estroma ovariano, além de estar relacionado com o desenvolvimento da rede de drenagem linfática do ovário (Brown et al., 2006). Já foi demonstrado que o gene da ADAMTS 1 é exclusivamente expresso em células foliculares da granulosa no momento da ovulação, na matriz que circunda os folículos ovarianos (ESPEY et al., 2000; RICHARDS et al., 2005) e que a indução de ADAMTS 1 é drasticamente reduzida, em ratos, quando a síntese de progesterona é inibida com epostano (agente antiprogesterona), bem como em ratos que não possuem receptor para progesterona (PR) (ROBKER et al., 2000). O padrão temporal da expressão deste gene, em conjunto com sua regulação pela progesterona, sugere que a metaloproteinase deste gene pode ter um papel importante no mecanismo de ovulação.

ADAMTS 1 é sintetizada como um pró-zimogênio e sofre glicosilação logo após a tradução da proteína. A secreção de ADAMTS 1 para a MEC requer a excisão desse pró-domínio da proteína madura de 87 kDa, por endopeptidases furina relacionadas. ADAMTS 1 pode ser processada e ser detectada como uma proteína de 65 kDa. A região C-terminal da protease madura liga-se diretamente na MEC e se associa com outras proteínas tais como fibulina-1, TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) latente e com proteoglicanos sulfatados. A protease catalisa a degradação do colágeno tipo I (REHN et al., 2007), proteoglicanos do estroma de tecidos específicos, como o versicam (RICCIARDELLI et al., 2011; RUSSELL et al., 2003), agrecom (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE et al., 2002), sindecam-4 (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE et al., 2009) e proteínas da membrana basal (nidogênio 1 e 2) (CANALS et al., 2006; TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013). Assim, a estrutura complexa de ADAMTS 1 pode, portanto, influenciar o ambiente tumoral por uma série de vias (TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013).

Em relação a sua função nos tumores, ADAMTS 1 possui efeito anti-angiogênico (Vázquez et al., 1999; Iruela-Arispe, Carpizo e Luque, 2003; Lee et al., 2006), no entanto, alguns trabalhos mostram que ADAMTS 1 tem sua expressão aumentada em tumores de alto grau de malignidade (Masui et al., 2001), podendo promover a proliferação (LIU; XU; YU, 2006), sobrevivência (RICCIARDELLI et al., 2011), migração e invasão celular (TYAN et al., 2012), talvez devido a sua capacidade de degradar o agrecan e o versican, os quais são componentes da matriz extracelular que funcionam como barreira a passagem da células. Dados do nosso laboratório mostram que em tumores mais agressivos de mama, existe uma diminuição nos níveis de ADAMTS 1 quando comparados ao tecido normal (FREITAS et al., 2013). Uma revisão da literatura mostra que o valor de expressão da proteína de ADAMTS1 está reduzida em diferentes tipos de câncer, inclusive no câncer de ovário (TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013).

Liu et al., 2006 (LIU; XU; YU, 2006) demonstraram que a ADAMTS 1 sofre auto-clivagem proteolítica, e que a proteína de ADAMTS 1 sem clivagem e os seus fragmentos exibem atividade pro- e anti-tumoral, respectivamente. Observou-se também que a atividade de metaloproteinase de ADAMTS 1 é necessária para o seu potencial pro-tumoral, favorecendo a metástase. Além disso, foi demonstrado que a atividade anti-tumoral dos fragmentos de ADAMTS 1 dependem do motivo TSP-1, que é mascarado na molécula de comprimento total, indicando que o efeito de ADAMTS 1 sobre a metástase do tumor depende se a molécula está clivada ou intacta.

A ADAMTS 4 foi inicialmente designada como "agrecanase 1" com base na sua capacidade para clivar a ligação Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ da proteína agrecom (TORTORELLA et al., 1999). Atualmente sabe-se que esta protease também é responsável pela clivagem de outros componentes da MEC, como o versican (SANDY et al., 2001) e o brevicam (MATTHEWS et al., 2000). Ela está envolvida com a remodelação da cartilagem e inflamação (KUNO et al., 2000), no processo de ovulação (RICHARDS et al., 2005), a modulação da plasticidade neural (TAUCHI et al., 2012) e esta presente nas fases precoces da destruição da cartilagem na artrite reumatoide e na osteoartrite (NAGASE;

KASHIWAGI, 2003; NAITO et al., 2007). ADAMTS 4 está presente em diversos tecidos como a medula espinal, útero, cérebro, coração e o ovário (WESTLING et al., 2002).

No ovário, ADAMTS 4 é expressa em células da granulosa de pequenos folículos em crescimento e tem sua expressão aumentada em resposta ao tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG) (RICHARDS et al., 2005). Antes do processo de ovulação, ADAMTS4 é induzida seletivamente nas células da teca dentro de 2 a 4 horas após a administração de hCG. A indução específica de ADAMTS4 nestas células e nesta fase do desenvolvimento folicular sugere que esta protease participa na cascata proteolítica, através da qual componentes da lâmina basal são degradados antes da ovulação e luteinização (RICHARDS et al., 2005).

ADAMTS 4 está estruturalmente e funcionalmente relacionada com ADAMTS 1. Possuem um peptídeo sinal, um pró-domínio que é clivado pela furina no momento da secreção, um domínio metaloproteinase que realiza a proteólise seletiva dos proteoglicanos da família hyalectan (formada pelos proteoglicanos agrecan, versican, brevican e neurocan), um domínio desintegrina com o potencial de se ligar as integrinas presentes na membrana celular e responsáveis pela adesão das células com a MEC, e uma região carboxi-terminal com motivos TSRs. O domínio TSR da ADAMTS 4 mostra fortes semelhanças com a sequência TRS da ADAMTS 1 (KARAGIANNIS; POPEL, 2007) e esta mostrou conter propriedades antiangiogênicas (LIU; XU; YU, 2006). Desta maneira ADAMTS 4 pode estar envolvida em processos antitumorígenicos.

Entretanto muitos dos substratos de ADAMTS 4 são proteoglicanos presentes em abundância na MEC. Por isso, é possível que esta metaloproteinase de vários domínios possa desempenhar um papel na angiogênese e progressão do tumor (KUMAR; RAO; GE, 2012). O aumento da expressão de ADAMTS4 foi observada em vários tipos de câncer humanos, como o de mama (PORTER et al., 2004), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (DEMIRCAN et al., 2009) e glioblastoma (HELD-FEINDT et al., 2006).

Usando um modelo de implante de tumor de melanoma de rato singênico, foi demonstrado que ADAMTS 4 sem clivagem, o qual possui seu domínio metaloproteinase ativo, foi capaz de promover o crescimento do câncer. Em contraste, as regiões C-terminais auxiliares e a proteína sem clivagem com ausência do domínio metaloproteinase inibiram o crescimento do tumor (RAO et al., 2013). Assim, ADAMTS 4 possui propriedades semelhantes a ADAMTS 1, uma vez que age de forma pro e antitumorigênica.

1.7 Hormônios sexuais

Hormônios esteroidais são moléculas regulatórias de natureza lipídica que atuam através de receptores localizados no núcleo das células alvo. Quando ocorre a ligação do hormônio ao seu receptor, este passa por uma mudança conformacional que o ativa, formando complexos e tornando-o capaz de promover ou inibir a transcrição de um grupo específico de genes (ALBERTS et al., 2002; COUSE; HEWITT; KORACH, 2006).

Os receptores de estrógeno ($Er\alpha$ e $Er\beta$) apresentam localização nuclear, assim como os receptores para andrógenos (AR), já os receptores de progesterona (PR) podem ter localização nuclear ou na membrana plasmática, e todos estes apresentam a estrutura clássica dos receptores de esteróides, composta por 4 domínios distintos: um domínio N-terminal regulador da transcrição, um domínio de ligação ao DNA com os clássicos dedos de zinco proximal e distal, uma região “dobradiça” e um domínio de ligação ao seu respectivo hormônio (COUSE; HEWITT; KORACH, 2006; MOSSELMAN; POLMAN; DIJKEMA, 1996;).

Estes hormônios estão integrados em cada aspecto da fisiologia reprodutiva dos mamíferos, em ambos sexos, incluindo o desenvolvimento, gametogênese, função das gônadas, do controle hipotálamo – pituitária, comportamento sexual e maternal, gestação e lactação.

Os hormônios esteroidais são produzidos em tecidos específicos do corpo e são divididos em duas classes, os hormônios sexuais e gestacionais e os hormônios adrenais. O colesterol é o esteroide de maior prevalência no organismo e precursor, entre outros, de hormônios sexuais como os estrógenos e as progestinas (LITWACK; TJ, 1998).

Diferentes tipos de células do ovário sintetizam preferencialmente determinados hormônios sexuais, as células da teca, por exemplo, produzem principalmente a androstenediona, hormônio esteroide precursor do andrógeno testosterona e dos estrógenos estrona e estradiol. A progesterona é produzida principalmente pelas células que formam o corpo lúteo, glândula endócrina temporária formada após o processo de ovulação. O tipo de hormônio esteroide produzido pelas células também muda com sua progressiva maturação, as células da granulosa de folículos em crescimento secretam principalmente estradiol e pouca ou nenhuma progesterona, enquanto após a ovulação, as células da granulosa luteinizadas secretam principalmente progesterona (PETERS; MCNATTY, 1980).

A mulher adulta é exposta continuamente a flutuações hormonais ao longo da vida, até a menopausa, como um resultado de ciclos reprodutivos, conhecidos como ciclos hormonais. Os ciclos são controlados pelo eixo hipotálamo-pituitária-ovário (HAWKINS; MATZUK, 2008).

Figura 7 - Flutuação dos níveis hormonais durante os ciclos fisiológicos femininos. Na puberdade, os altos níveis de estrógeno atuam nas células hormônio-responsivas, estimulando a proliferação. Na fase lútea do ciclo reprodutivo, ocorre um

aumento de progesterona estimulando as células hormônio-responsivas à proliferação. No início da gravidez, a progesterona juntamente com a prolactina, atuam estimulando a mama para a secreção láctea. Adaptado de (JOSHI; DI GRAPPA; KHOKHA, 2012).

A progesterona e o estradiol são importantes reguladores dos processos de proliferação e diferenciação celular no trato genital feminino. Alterações da resposta destes hormônios podem estar relacionadas ao aparecimento de doenças estrogênio-dependentes como a endometriose, câncer de endométrio, infertilidade, câncer de mama e ovário (ROMANO et al., 2006).

No câncer os hormônios sexuais modulam a proliferação, apoptose, migração, metástase e angiogênese, influenciando desde o processo de tumorigênese, o crescimento celular e a metástase (RAMACHANDRAN, 2011). O papel dos hormônios no câncer de ovário incluem fatores de proteção e de risco para a doença. Contraceptivos hormonais são um fator de proteção estabelecido para o câncer de ovário. Uma reanálise de 45 estudos distintos realizados em 21 países mostrou que quanto mais tempo uma mulher usa anticoncepcionais hormonais, menor o risco de se desenvolver esta neoplasia (BERAL et al., 2008). Estudos mostram que o tratamento de reposição hormonal, tanto o com a utilização somente de estrogênio, como o uso combinado deste com progestina, aumenta o risco em desenvolver câncer de ovário (PEARCE et al., 2009).

1.8 Progesterona

A progesterona é produzida pelo corpo lúteo, uma estrutura glandular transitória, que inicia seu desenvolvimento no ovário imediatamente após a ovulação, e esta relacionada com a preparação do útero para a aceitação do embrião, à preparação das mamas para a secreção láctea, o crescimento folicular, a ovulação e a luteinização (SCHAMS; BERISHA, 2002).

A progesterona (P4) ou respostas celulares a P4 parecem oferecer proteção contra o desenvolvimento do câncer de ovário (HO, 2003). A progesterona protege as células da hiperestimulação estrogênica, pois diminui o número de receptores para o estrógeno, aumenta seu metabolismo intracelular e inibe a conversão da androstenediona em estrona, reduzindo a atividade mitótica das células (VOIGT et al., 1991). Deficiências de progesterona, devido à menopausa, a infertilidade ou alterações no gene de PR estão associados com um risco aumentado de câncer de ovário (EDMONDSON; MONAGHAN, 2001; SYED et al., 2001). Estudos clínicos têm demonstrado que a multiparidade, a gravidez de gêmeos, e a gravidez que ocorre na vida adulta aumentam drasticamente os níveis de progesterona em circulação e reduzem o risco de desenvolver câncer de ovário (ADAMI et al., 1994; BANKS; BERAL; REEVES, 1997). Além disso, já foi observado que a expressão de receptores para progesterona estão relacionados com um melhor prognóstico em mulheres com câncer de ovário (LEE et al., 2005; LENHARD et al., 2012). O uso de contraceptivo oral hormonal tem sido consistentemente associado a uma redução no risco de desenvolvimento do câncer de ovário (BERAL et al., 2008; DIEP et al., 2015). Já foi observado que formulações de contraceptivos orais com altos níveis de progesterona estão associadas a um menor risco de câncer de ovário do que as formulações com baixos níveis de progestina (SCHILDKRAUT et al., 2002). No entanto, acredita-se que a maior parte dos efeitos protetores da progesterona são mediados pelo receptor da progesterona nuclear (n-Pr), os quais se perdem progressivamente com o aumento do grau de malignidade do câncer de ovário (AKAHIRA et al., 2002).

1.9 Estrógeno

O estradiol, hormônio esteróide produzido pelas células da granulosa de folículos em desenvolvimento (GINTHER et al., 2003) é responsável pelo aparecimento das características sexuais secundárias, inibição do eixo hipotálamo-hipofisário por feedback, estimulação da oogênese, regulação do

endométrio e da homeostase cardiovascular (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSNINA, 2004).

Evidências associam o estrogênio com o aumento da incidência do câncer de ovário (GAMBACCIANI et al., 2003; GREISER; GREISER; DÖREN, 2007). Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que o uso a longo prazo de terapia de reposição hormonal com estrógeno aumenta o risco de câncer de ovário (LACEY et al., 2002; MØRCH et al., 2009), pois diminui a secreção de gonadotrofinas, e já foi observado que níveis decrescentes de gonadotrofinas estão associados a um maior risco no desenvolvimento deste tipo de câncer (HELZLSOUER et al., 1995). Estudos experimentais tanto in vivo como in vitro também implicam um papel do estrógeno na carcinogênese do ovário, pois a sobrevivência e proliferação das células poderiam ser reforçadas por este hormônio (BAI et al., 2000; CHOI et al., 2001; SONG et al., 2005). Os estrogênios estimulam a proliferação de linhagens de células de câncer de ovário e células epiteliais da superfície dos ovários normais em cultura. Em contraste, o crescimento é inibido por antagônistas de ER (SYED et al., 2001). O estrógeno pode melhorar a motilidade das células de tumor do ovário, desencadeando a transformação epitélio mesenquimal através do receptor ER α , além disso é capaz de reforçar a capacidade migratória das células através da maior regulação transcricional dos repressores de E-caderina, Snail e Slug (PARK et al., 2008).

1.10 Testosterona

Em mulheres, a síntese dos andrógenos ocorre principalmente na zona fasciculada da adrenal (25%) e no estroma ovariano (25%). Os 50% restantes são produzidos no fígado, pele e tecido adiposo (EL-ALFY et al., 1999).

Após a testosterona ser sintetizada ocorre a formação do complexo hormônio-transportador (testosterona-proteína transportadora de hormônios sexuais) o qual é liberado na circulação para atingir tecidos-alvos onde o complexo é dissociado para que a testosterona exerça seus efeitos celulares.

O andrógino, então na forma livre, liga-se ao receptor para andrógenos, desencadeando os efeitos celulares deste esteroide (JONES; HUGH JONES; CHANNER, 2004). Dentre os principais efeitos da testosterona estão: a indução das características sexuais secundárias relacionadas com a puberdade (BAIN, 2007), inibição da atividade dos osteoclastos e estimulação da atividade dos osteoblastos levando, portanto, a uma menor reabsorção óssea e maior fixação do osso (Tivesten et al., 2004; Davey e Morris, 2005), desenvolvimento e manutenção da massa muscular (SINHA-HIKIM et al., 2006), efeito sobre a libido, excitação e ereção (MORLEY; PERRY, 2003).

Evidências indiretas sugerem um possível papel etiológico para andrógenos no início e / ou progressão do câncer de ovário. Contraceptivos orais, que suprimem andrógenos, são inversamente associado com o risco de câncer de ovário (GREER et al., 2005) enquanto síndrome dos ovários policísticos e obesidade central, que são caracterizadas por níveis elevados de andrógenos, estão associados com risco aumentado de câncer de ovário (MINK et al., 1996). Além disso, foi relatada em mulheres transexuais submetidas à suplementação de testosterona uma maior incidência de câncer de ovário (DIZON et al., 2006). Vários estudos in vitro demonstraram aumento da proliferação de células epiteliais da superfície de ovários normais após administração de andrógenos (EDMONDSON, MONAGHAN E DAVIES, 2002; SYED et al., 2001). Por fim, os pacientes com endometriose que tinham sido tratados com Danazol (que suprime a secreção hipofisária de gonadotrofinas, mas tem propriedades androgênicas) tiveram um risco 3 vezes maior de desenvolver câncer de ovário, em comparação com os pacientes que tomaram Leuprolide (um hormônio antagonista liberador de gonadotropina) ou nenhuma medicação (NESS, 2003).

1.11 Modelo utilizado

Linhagens celulares derivadas de tumores são os modelos mais utilizados em pesquisa sobre o câncer (DOMCKE et al., 2013), pois essas

amostras patológicas mimetizam o estado real do tumor in vivo e muitas vezes proporcionam resultados reprodutíveis, que fornecem informações para a compreensão da biologia dos tumores e aplicação na clínica médica (VAN STAVEREN et al., 2009).

No presente estudo, utilizamos linhagens de ovário comerciais, com diferentes graus de malignidade. A linhagem ES-2 com fenótipo agressivo, e a linhagem NIH-OVCAR-3 com fenótipo menos agressivo e mais diferenciado.

Carcinoma de células claras (CCC) do ovário é um subtipo de câncer epitelial de ovário conhecido por sua relativa resistência à quimioterapia baseada em platina e de prognóstico ruim (KWOK et al., 2014). ES-2 é uma linhagem de CCC humana estabelecida em 1980 a partir de uma amostra de tumor cirúrgico retirado de uma mulher negra de 47 anos. O tumor foi descrito como um carcinoma de células de ovário pouco diferenciado. Inicialmente, as células foram cultivadas em ágar macio, um indicador de transformação e tumorigenicidade. As células exibem uma baixa a moderada resistência para um número de agentes quimioterapêuticos, incluindo doxorubicina, cisplatina, carmustina, etoposido e ciano morfolino doxorubicina (COLLECTION, 2014a). Esta linhagem celular não possui receptores para estrogênio (ER -) (HALON et al., 2011) e receptores nucleares de progesterona (n-PR -); e possui receptores de membrana para a progesterona (m-PR +) (CHARLES; THOMAS; LANGE, 2010).

Adenocarcinoma é um tipo de câncer que se forma nas glândulas secretoras de muco ao longo do corpo. A linhagem NIH-OVCAR-3 foi estabelecida a partir de ascites malignas, de uma mulher caucasiana de 60 anos de idade com adenocarcinoma de ovário progressivo, após a quimioterapia de combinação com ciclofosfamida, adriamicina e cisplatina. A linhagem cresce em monocamada e é tumorigênica em ratos atímicos (HAMILTON et al., 1983). Esta linhagem possui receptores para estrógeno, progesterona e andrógenos (COLLECTION, 2014b).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar se os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona influenciam os níveis das proteases ADAMTS 1 e 4 em células tumorais de ovário.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar se os níveis de mRNA e proteínas de ADAMTS 1 e 4 são alterados na presença dos hormônios sexuais estrógeno, progesterona e testosterona em linhagens celulares de ovário humanas com diferentes graus de malignidade;
- II. Avaliar se a localização das proteases ADAMTS 1 e 4 são alteradas na presença dos hormônios sexuais estrógeno, progesterona e testosterona em linhagens celulares de ovário humanas com diferentes graus de malignidade;
- III. Avaliar se com a exposição à progesterona há alterações na capacidade migratória e invasiva das linhagens de câncer estudadas.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

A linhagem NIH-OVCAR-3, derivada de um adenocarcinoma de ovário, possui morfologia epitelióide e a linhagem ES-2 foi desenvolvida a partir de um carcinoma de células claras de ovário e possui aspecto fusiforme. As células foram obtidas do acervo do Banco de Células do Rio de Janeiro e foram cultivadas em DMEM/Ham's F-12 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

ES-2

NIH-OVCAR-3

Figura 8 - Imagens representativas das linhagens celulares de câncer de ovário ES-2 e NIH-OVCAR-3.

O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste fase, e o meio de cultura 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-metilsulfóxido (DMSO–Sigma).

3.2 Tratamentos das linhagens celulares com hormônios

As células ES-2 e NIH-OVCAR-3 foram plaqueadas em placas de 60 mm² (Corning, New York, USA) em uma densidade de 1×10^6 de células, em DMEM F12 sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidas na estufa de CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS, e foi adicionado DMEM/F12 sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino livre de esteróides (soro previamente tratado com carvão Dextrana, Gibco). As células foram incubadas novamente em estufa de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, o DMEM/F12 sem soro fetal bovino contendo os hormônios Progesterona (P4) 1 µM, Estrógeno (E2) 30 nM ou Testosterona (DHT) 100nM (Sigma) foi adicionado. Como controle utilizamos o DMEM/F12 sem soro fetal bovino e sem os hormônios.

As linhagens celulares NIH-OVCAR-3 e ES-2 foram cultivadas também na presença do inibidor de progesterona RU486 (7 µM) (Mifepristone ≥98%, Sigma) por 24 horas, sozinho ou em combinação com 1 µM de P4. A justificativa para este experimento foi avaliar se o aumento nos níveis proteicos das ADAMTS 1 e 4 proporcionados pela P4 poderia ser inibida por reagente antiesteroidal.

3.3 MTT

O teste do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal

espectrofotométrico. Após o tratamento hormonal das células por 24 horas (as células mantidas em meio DMEM F12 sem SFB e sem vermelho fenol foram utilizadas como controle) o teste do MTT foi realizado de acordo com os seguintes passos (Mosmann, 1983), primeiramente realizou-se a remoção do sobrenadante das culturas de células e foi adicionado 100 µL de meio fresco DMEM F12 e 10 µL de MTT (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) a 5 mg/mL em PBS, para uma concentração final de 0,5 mg/mL. As células foram mantidas na estufa durante 3 horas, até à formação de cristais azuis. Foi então adicionado 100 µL de DMSO, para dissolução dos cristais, a placa foi homogeneizada e realizou-se a leitura da absorbância a 570 nm em um espectrofotômetro.

3.4 PCR em tempo real

Os níveis de expressão gênica das ADAMTS 1 e 4 (mRNA) foram analisados por qPCR. O isolamento do RNA total das células foi realizado com o kit Magno Bead RNA total (Invitrogen, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após a verificação da integridade do RNA, através de gel de agarose, realizamos transcrições reversas (RT) utilizando termoclicador.

Após a realização da transcrição reversa, diferentes frações de cDNAs foram utilizadas na amplificação em cadeia por polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a amplificação em tempo real (Corbett Rotor-Gene 6000, Corbett, Oregon, USA). As amplificações foram executadas com produto da reação de transcrição reversa, SYBR Green PCR (Invitrogen) e primers.

A seqüência dos iniciadores (primers) para detecção de ADAMTS-1 foram as seguintes - primer senso 5' GGACAGGTGCAAGCTCATCTG 3' e primer anti-senso 5' TCTACAACCTTGGGCTGCAAA 3'. Para ADAMTS-4 primer senso 5' TCAGCCTTCACTGCTGCTCAT-3' e anti-senso 5'-GCCCATTCAAACTGATGCATG 3'. As condições de ciclagem foram padronizadas previamente de acordo com as características de cada primer. Todas as reações foram normalizadas de acordo com a expressão do gene

GAPDH, primer senso 5'CTAAGCGTGTTATCATCTCAG 3' e anti-senso 5' GACTTGTCATATTTCTCATGG 3'.

A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde C_t é o ciclo de início de quantificação do transcrito, ΔC_t é o C_t do gene de interesse menos o C_t do gene de referência (GAPDH) e $\Delta\Delta C_t$ é o ΔC_t da amostra tratada com hormônio menos o ΔC_t da amostra controle (Livak e Schmittgen, 2001).

Os valores de absorbância obtidos por qPCR foram submetidos à análise estatística com ANOVA ou análise comparativa (test t), utilizando GraphPad Prism 5 computador software (GraphPad, San Diego, CA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

3.5 Immunoblot

Ensaio de *immunoblot* foram realizados para avaliar a influência hormonal sobre os níveis de expressão proteica das proteases ADAMTS 1 e 4. Foram analisados o meio condicionado, representando o material secretado, e o lisado total, representando o material que permaneceu dentro da célula.

As células foram plaqueadas em placas de 60 mm², em meio contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) na concentração de 3×10^6 , e mantidas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂, por 24 horas. Após as 24 horas, o meio de cultura foi trocado pelo meio de cultura contendo suplementado com 10% de soro fetal bovino livre de esteróides (tratamento com carvão Dextrana, Sigma). Passadas 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos hormônios sexuais 1 mM progesterona (P4), 30 nM estrógeno (E2) ou 100 nM de testosterona (DHT) em meio sem soro. As amostras controle foram mantidas no meio de cultura sem soro.

Após 24 horas de tratamento com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona, o meio condicionado foi recolhido em tubos contendo inibidor de protease (1 mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF e 1mg/ml

E-64), a amostra foi centrifugada por 10 minutos na rotação de 1000g na temperatura de 4°C. O “pellet” de células formado no fundo do tubo foi descartado, e em seguida, para realizar a precipitação das proteínas do meio condicionado, adicionaremos 800 µl de álcool etílico absoluto em cada amostra. As amostras foram incubadas em gelo seco, por 15 minutos, e centrifugadas por adicionais 10 minutos na rotação de 13400g na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 500 µl de álcool etílico absoluto em cada amostra, e centrifugado por 10 minutos na rotação de 13400g à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, e o tubo contendo a amostra ficou em temperatura ambiente por 45 minutos para a evaporação do etanol e secagem das proteínas precipitadas.

Para a obtenção do lisado celular foi utilizado o tampão RIPA contendo inibidores de protease (1 mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF e 1mg/ml E-64). Os lisados foram sonicados e, em seguida, centrifugados a 10000g por 10 minutos a 4°C. A quantificação foi realizada através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA). Em seguida, foram ressuspensas em tampão de amostra (*sample buffer*), contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada seguindo o método SDS-PAGE. Foram carregadas 30 µg de proteína por poço, que foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (preparado com 1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em TBS-tween 20 (TTBS) e incubadas com anticorpos que reconheçam as proteases ADAMTS-1 (MAB 1810, Millipore) e ADAMTS-4 (ab84792, ABCAM). Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. A reação então foi revelada no equipamento MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Biocompare). Para possibilitar marcação com mais de um anticorpo, as membranas foram “stripped” com “Restore Western Blot Stripping Buffer”

(Pierce) e submetidas a novas marcações. Como controle positivo, foi utilizado o anticorpo primário β - actina ou GAPDH.

Os valores obtidos na densitometria das bandas, foram submetidos à análise estatística OneWay ANOVA, e análise comparativa entre dois grupos (test t) utilizando *GraphPad Prism 5 computador software* (GraphPad, San Diego, CA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

3.6 Imunofluorescência indireta

Concomitante à análise proteica por immunoblot, foi analisado também a imunolocalização das proteínas ADAMTS 1 e 4 nas linhagens celulares tratadas com hormônios sexuais. Adicionalmente foi analisado a presença e distribuição dos receptores desses hormônios.

As linhagens celulares ES-2 e NIH-OVCAR-3, foram depositadas sobre lamínulas de vidro, na concentração de 2×10^5 com 1 ml de DMEM/Ham's F-12, e mantidas em estufa de CO₂ por 24 horas. Todas as linhagens foram cultivadas em duplicata, e receberam o mesmo tratamento com os hormônios estrógeno, progesterona e testosterona, conforme protocolo já descrito acima. Passadas 24 horas do tratamento hormonal, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS, e incubadas com 100 μ l de 10% Normal Goat Serum (KPL, Gaithersburg, USA) por 1 hora.

Para avaliar a imunolocalização da molécula de ADAMTS 1, as lamínulas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com o PBS, e incubadas com 100 μ l de anticorpo primário ADAMTS-1 (ab28284, Abcam), ADAMTS 4 (AB84792, Abcam), na diluição de 1:50 em PBS, por 1 hora. As lamínulas foram lavadas novamente por 3 vezes de 5 minutos com PBS, e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), na concentração de 1:2000, diluído soro de cabra (KPL, Gaithersburg, USA), por 1 hora no escuro. Em seguida, as lamínulas

foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com PBS, e incubadas com Faloidina-Alexa 488, na concentração de 1:10, diluída em PBS, por 15 minutos no escuro. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS, e as lâminas foram montadas com Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

A substituição do anticorpo primário por PBS foi utilizado como controle negativo. Os resultados foram analisados por microscopia confocal (Revolution Yokogawa-based spinning disk system, Andor, UK).

3.7 Ensaio de invasão

Para o ensaio de invasão utilizamos o sistema de câmaras bipartites do tipo *Transwell*. O diagrama a seguir mostra o ensaio de invasão em câmara bipartite *Transwell*.

Figura 9 - Representação esquemática do ensaio de invasão.

O Matrigel® (BD) foi polimerizado diluído 1:6 em DMEM sem soro sobre a membrana da câmara. As células NIH-OVCAR-3 e ES-2 foram tripsinizadas

de seus respectivos frascos de cultura ressuspensos em número de 3×10^5 células/ml de DMEM sem soro para cada poço.

Os grupos experimentais foram compostos pelos grupos de células em meio contendo progesterona e pelo grupo controle, que não irá conter o hormônio. Essas células foram colocadas na câmara superior de migração. Dessa forma, tínhamos células sobre a membrana porosa coberta por matriz. Na câmara inferior foi adicionado DMEM com 10% de SFB na presença ou ausência da progesterona. A placa multipoço foi coberta e incubada por 48 horas a 37 °C na estufa de CO₂ para que ocorresse a digestão da Matriz 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 a matriz e migraram, ficando localizadas na face inferior da membrana. Essas células foram fixadas em 4% paraformaldeído diluído 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.

3.8 Ensaio de migração

No ensaio de migração utilizamos o sistema de câmaras bipartites do tipo *Transwell*. As células NIH-OVCAR-3 ou ES-2, após permanecerem 24 horas em meio DMEM F12 sem fenol e suplementado com 10% de SFB tratado com carvão dextrana, foram tripsinizadas de seus respectivos frascos de cultura e ressuspensas em 1 mL de meio DMEM F12 sem soro. As células foram então contadas em câmara de Neubauer e foram plaqueadas $1,0 \times 10^5$ células em cada poço da câmara Transwell, a câmara possui 10 poços. Essas células foram colocadas na câmara superior de migração. Dessa forma, tínhamos células sobre a membrana porosa. Os grupos experimentais

consistem em meio contendo 1 mM P4, que estava no compartimento superior, agindo diretamente sobre as células e o controle, que não foi tratado por hormônios, os compartimentos foram preenchidos com meio DMEM F12 livre de SFB ou com 10% de SFB. A placa multipoços foi coberta e incubada por 24 ou 48 horas a 37 °C na estufa de CO₂ para que ocorresse a migração 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 migraram e meio de cultura) da câmara superior. Nessa situação restaram somente as células que migraram pela membrana porosa, ficando localizadas na face inferior da membrana. Essas células foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos, 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 no programa Image J (The National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA). Cada experimento será realizado em triplicata, pelo menos 3 vezes.

3.9 Ensaio de ferida

As linhagens celulares de câncer de ovário cresceram em placas de 60 mm³ até atingirem a confluência de 80%. Em seguida, foi feita uma “ferida” na monocamada, através de delicada passagem de ponteira de pipeta de 10 µL sobre a mesma. Esta passagem determinou uma descontinuidade na monocamada, cujas células em sua margem tenderam a migrar para os espaços vazios.

Depois de realizadas as “feridas”, as células cresceram em meio acrescido com 1 µM de P4 sozinho ou em conjunto com 7 µM de RU486. Células mantidas em meio DMEMF12 sem SFB e sem vermelho fenol serviram como controle. Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada placa, a fim de permitir obtenção de fotomicrografias das mesmas regiões das “feridas” em diferentes tempos (0 e 24 horas). A migração celular foi avaliada

como área livre (arbitrariamente marcada como região com ausência de células) e foi medida com auxílio do programa Image J (software de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA), sendo que o decréscimo percentual da área da “ferida” caracterizou o índice de migração celular. Os ensaios foram obtidos em triplicata de cada grupo testado.

4.1 Comparação dos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 nas linhagens celulares NIH-OVCAR-3 e ES-2

Inicialmente comparamos os níveis basais das proteases ADAMTS 1 e 4 presentes nas linhagens NIH-OVCAR-3 e ES-2, tanto o lisado como o meio condicionado foram analisados por Western Blot.

No Western Blot feito para avaliar o conteúdo das proteases produzida pelas células mas ainda não secretadas, ou seja, o lisado celular, é possível observar que apesar de não significativa, a protease ADAMTS 1 tem uma tendência em estar mais presente na linhagem ES-2 em comparação a linhagem NIH-OVCAR-3 ($p=0,1075$) (Figura 10, A e B).

Já para ADAMTS 4 notamos que a linhagem NIH-OVCAR-3 possui uma expressão proteica maior desta protease em relação a linhagem ES-2 ($**p=0,0025$) (Figura 10, A e C).

Na análise do Western Blot feito para avaliar o conteúdo das proteases secretadas, ou seja, o meio condicionado, é possível notar que o anticorpo reconheceu duas bandas em alturas distintas para a ADAMTS 1 (Figura 11 A, imagem superior). Uma das bandas aparece na altura de 110 kDa e corresponde a protease ADAMTS 1 sem nenhuma clivagem, a outra banda aparece na altura de 65 kDa e corresponde a protease ADAMTS 1 sem o pró-domínio e com deleção proteolítica das duas últimas repetições de TSP.

Foi observado que ambas as linhagens estudadas secretam a protease ADAMTS 1 na sua isoforma de 65 kDa, entretanto somente a linhagem mais agressiva e menos diferenciada, ES-2, secreta ADAMTS 1 com o peso molecular de 110 kDa, sendo esta diferença estatisticamente significativa em comparação a mesma banda da linhagem NIH-OVCAR-3 ($***p=0,0003$) (Figura 11, A e B).

Para ADAMTS 4 não foi possível identificar diferença nos níveis protéicos da protease secretada entre as linhagens NIH-OVCAR-3 e ES-2 (Figura 11, A e C).

Figura 10 - Proteases ADAMTS 1 e 4 presentes no lisado das células NIH-OVCAR-3 e ES-2. Para a análise do lisado celular as linhagens estudadas foram mantidas em meio DMEM F12 sem SFB e sem vermelho fenol por 24 horas. Foram analisadas as proteases ADAMTS 1 (A e B) e 4 (A e C). A β-actina foi utilizada como controle de carregamento. Foi verificado que a linhagem ES-2 tem uma tendência em expressar em maiores quantidades a proteína ADAMTS 1 em relação a NIH-OVCAR-3 ($p=0,1075$); e que a linhagem NIH-OVCAR-3 tem uma maior expressão proteica de ADAMTS 4 em relação a linhagem ES-2 (** $p=0,0025$). Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

Figura 11 - Proteases ADAMTS 1 e 4 secretadas pelas células NIH-OVCAR-3 e ES-2. Para a análise do meio condicionado as linhagens estudadas foram mantidas em meio DMEM F12 sem SFB e sem vermelho fenol por 24 horas. O sobrenadante foi recolhido, centrifugado e precipitado em etanol. Foram analisadas as proteases ADAMTS 1 (A e B) e 4 (A e C). Foi verificado que a linhagem ES-2 expressa maiores quantidades da proteína ADAMTS 1 com o peso molecular de 110 kDa em relação a NIH-OVCAR-3 (** $p=0,0003$); e que não há alteração de ADAMTS 4 entre as linhagens. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

4.2 Efeito dos hormônios sexuais na viabilidade celular

Avaliamos se a viabilidade celular seria alterada na presença dos hormônios, estrógeno (30 nM), progesterona (1 μ M) ou testosterona (100 nM) em comparação ao controle (sem tratamento hormonal) no período de 24 horas, através do ensaio de MTT. Esse ensaio revelou que as linhagens celulares de câncer de ovário NIH-OVCAR-3 e ES-2 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle sem soro após 24 horas de tratamento com os hormônios sexuais estrógeno (NIH-OVCAR-3 $p=0,5454$; ES-2 $p= 0,5744$), progesterona (NIH-OVCAR-3 $p=0,7348$; ES-2 $p= 0,5076$) ou testosterona (NIH-OVCAR-3 $p=0,7372$; ES-2 $p= 0,6316$) (Figura 12, A e B). Desta maneira, alterações nos níveis de expressão gênicos e proteicos das proteases não estão relacionadas com o aumento ou diminuição da viabilidade celular induzida pelos hormônios.

Figura 12 - Viabilidade das células NIH-OVCAR-3 e ES-2 na presença dos hormônios. As células NIH-OVCAR-3 (A) e ES-2 (B) foram tratadas durante 24 horas com 30 nM de estrógeno, 1 μ M de progesterona ou 100 nM de testosterona. As amostras controle foram mantidas no meio de cultura sem soro ou em presença de 10% de soro fetal bovino. Houve diferença estatisticamente significativa somente entre a amostra controle tratada sem soro e a amostra controle tratada com 10% de SFB na linhagem ES-2 (* $p=0,0317$). Na linhagem NIH-OVCAR-3 a amostra controle tratada sem soro teve uma tendência a ter uma viabilidade menor em relação à amostra controle tratada com 10% de SFB ($p=0,0549$). Significância estatística quando $p \leq 0,05$.

4.3 Efeito dos hormônios sexuais nos níveis de mRNA de ADAMTS 1 e 4

De forma a avaliar a expressão dos níveis de mRNA de ADAMTS 1 e 4 nas linhagens celulares de câncer de ovário, realizamos o experimento de PCR em tempo real. Conforme já descrito no material e métodos, todas as linhagens foram tratadas com os hormônios estrógeno (30 nM), progesterona (1 μ M) ou testosterona (100 nM) no período de 24 horas, e em todos os experimentos era mantido um grupo em meio sem soro e sem tratamento com os hormônios, utilizado como controle.

Nenhum dos hormônios avaliados foi capaz de levar a alterações significantes na expressão de mRNA da protease ADAMTS 1 na linhagem NIH-OVCAR-3 (Figura 13, A). O tratamento com o hormônio sexual testosterona na linhagem mais diferenciada, NIH-OVCAR-3, foi o único a induzir alterações estatisticamente significantes na expressão gênica de ADAMTS 4 em relação ao controle (* $p=0,0254$) (Figura 13, B). No entanto, na linhagem de células menos diferenciadas, ES-2, os níveis de mRNA de ADAMTS 1 e 4 foram reduzidas quando as células foram tratadas com os hormônios estrógeno (ADAMTS 1 * $p= 0,0286$; ADAMTS 4 *** $p< 0,0001$) e testosterona (ADAMTS 1 ** $p=0.0094$; ADAMTS 4 ** $p=0,0042$) em comparação com o controle (Figura 13, C e D). Observou-se também, nesta mesma linhagem celular, um aumento nos níveis de mRNA de ADAMTS 1 e 4, quando tratados com a progesterona (ADAMTS1 * $p=0,0484$; ADAMTS 4 * $p= 0,0368$) em relação ao controle (Figura 13, C e D).

Figura 13 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona na expressão gênica de ADAMTS 1 e 4 nas linhagens NIH-OVCAR-3 e ES-2 . As células NIH-OVCAR-3 (A e B) e ES-2 (D e E) tratadas por 24 horas com 30 nM estrógeno, 1 μ M progesterona ou 100 nM testosterona comparadas à amostra controle. Os valores dos níveis de mRNA de ADAMTS 1 e 4 presentes em cada amostra foram normalizados com os níveis de mRNA de GAPDH. Foi verificado para a linhagem NIH-OVCAR-3 diminuição na expressão gênica de ADAMTS no tratamento com testosterona (* $p=0,0254$). Para a linhagem ES-2 verificou-se que tanto para ADAMTS 1 e ADAMTS 4 o estrógeno (ADAMTS 1 ** $p=0,0286$; ADAMTS 4 *** $p<0,0001$) e a testosterona (ADAMTS 1 ** $p=0.0094$; ADAMTS 4 $p^{**}=0,0042$) diminuíram a expressão gênica, enquanto que a progesterona elevou os níveis gênicos para estas proteases (ADAMTS1 * $p=0,0484$; ADAMTS 4 * $p=0,0368$). Significância quando $p\leq 0,05$.

4.4 Efeito dos hormônios sexuais nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4

De forma a avaliar se a expressão dos níveis de proteína de ADAMTS 1 e 4 das linhagens celulares de câncer de ovário eram alterados quando as células eram submetidas ao tratamento hormonal, ou se tais hormônios induziriam a secreção da protease para o meio extracelular, realizamos o experimento Western Blot. Todas as linhagens foram tratadas com os hormônios estrógeno (30 nM), progesterona (1 μ M) ou testosterona (100 nM) no período de 24 horas, e em todos os experimentos era mantido um grupo sem tratamento hormonal, para utilizarmos como comparativo.

Na análise do lisado celular da linhagem NIH-OVCAR-3 é possível observar que o hormônio que levou a um aumento significativo na expressão proteica tanto de ADAMTS 1 (* $p \leq 0,05$) (Figura 14, A e B) como de ADAMTS 4 (* $p \leq 0,05$) (Figura 14, A e C) em comparação ao controle (C) foi a progesterona (P4).

Na análise do meio condicionado, ou seja, das proteases que foram secretadas pelas células, da linhagem NIH-OVCAR-3 é possível observar que o hormônio sexual progesterona (P4) foi o que mostrou maior tendência em aumentar a protease ADAMTS 1 ($p=0,0650$), quando este é comparado à amostra controle (C) (Figura 15, A e C). Tanto a progesterona (P4) ($p= 0,0959$), como o estrógeno (E2) ($p= 0,0946$) (Figura 15, A e D), mostraram tendência a aumentar ADAMTS 4 no meio condicionado das células NIH-OVCAR-3.

Figura 14 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem NIH-OVCAR-3. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) ou testosterona (DHT) e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. No lisado, observa-se um aumento acentuado dos níveis de ADAMTS 1 (* $p \leq 0,05$) (A e B) e 4 (* $p \leq 0,05$) (A e C) no grupo tratado com progesterona em comparação com o controle. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

Figura 15 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona na expressão das ADAMTS 1 e 4 secretadas pela linhagem NIH-OVCAR-3. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) ou testosterona (DHT) e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. No meio condicionado, observa-se para a protease ADAMTS 1 (A e C) aumento nos níveis proteicos quando tratada com a progesterona ($p=0,0650$), e para ADAMTS 4 (A e D) aumento nos níveis proteicos quando tratada com progesterona ($p=0,0959$) e estrógeno ($p=0,0946$) em comparação com o controle. A imagem B representa a membrana de nitrocelulose corada pelo corante de Ponceau utilizada como controle de carregamento. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

Na análise do lisado celular da linhagem ES-2 é possível observar que, assim como na linhagem mais diferenciada, NIH-OVCAR-3, o hormônio que levou a um aumento significativo na expressão proteica tanto de ADAMTS 1 (Figura 16, A e B) como de ADAMTS 4 (Figura 16, A e C) em comparação ao controle (C) foi a progesterona (P4) (ADAMTS1 * $p=0,0322$ e ADAMTS 4 ** $p=0,0067$).

Na análise do meio condicionado da linhagem ES-2 é possível constatar que nenhum dos hormônios analisados foi capaz de levar a alterações nos níveis proteicos da protease ADAMTS 1 (Figura 17, A e B). Entretanto para ADAMTS 4 a testosterona (** $p=0,0074$) foi eficaz em aumentar a expressão proteica desta protease, quando comparada ao controle (Figura 17, A e C).

Figura 16 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem ES-2. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) ou testosterona (DHT) e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. No lisado, observa-se um aumento acentuado dos níveis de ADAMTS 1 (A e B) e 4 (A e C) no grupo tratado com progesterona (ADAMTS1 * $p=0,0322$ e ADAMTS 4 ** $p=0,0067$) em comparação com o controle. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

Figura 17 - Efeito dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 secretadas pela linhagem ES-2. As amostras foram tratadas com hormônios estrógeno (E2), progesterona (P4) ou testosterona (DHT) e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. No meio condicionado observa-se que para ADAMTS 1 os hormônios não foram eficientes em promover alterações na expressão da protease. Para ADAMTS 4 a testosterona mostrou-se capaz de elevar os níveis proteicos da protease em relação ao controle (** $p=0,0074$). A imagem B representa a membrana de nitrocelulose corada pelo corante de Ponceau utilizada como controle de carregamento. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

4.5 Efeitos da utilização do antagonista do receptor de progesterona, RU486 (Mifepristone) sobre a expressão proteica de ADAMTS 1 e 4

Para avaliar se o aumento de ADAMTS 1 proporcionado pela progesterona no lisado e meio condicionado da linhagem NIH-OVCAR-3 e lisado da linhagem ES-2 ocorreu devido a ativação do receptor de progesterona, foi utilizado o reagente RU486 (antagonista do receptor de progesterona), e a expressão proteica do lisado e meio condicionado das células tratadas sozinhas ou em conjunto com o RU486 foi analisada por Western Blot.

No lisado celular da linhagem NIH-OVCAR-3 é possível notar que para ambas as proteases, ADAMTS 1 (Figura 18, A e B) e 4 (Figura 18, C e D), o tratamento com o antagonista do receptor de progesterona, RU486, foi capaz de reverter o aumento dessas proteases induzido pela progesterona (ADAMTS 1 $*p=0,0435$ e ADAMTS 4 $*p=0,0466$).

Para o meio condicionado da linhagem NIH-OVCAR-3 é possível observar que a inibição ocorreu de forma eficaz para a protease ADAMTS 1 (Figura 19, A e C), onde o tratamento com o antagonista de progesterona, RU486, levou a diminuição da expressão proteica em relação as células tratadas somente com progesterona ($*p=0,0441$). Não foi observado alterações estatisticamente significantes para ADAMTS 4 (Figura 19, A e D)

Figura 18 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem NIH-OVCAR-3. As amostras foram tratadas com o hormônio progesterona (P4) ou progesterona mais o antagonista RU486 e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. Para ambas as proteases houve diminuição da expressão proteica quando tratadas com progesterona e o antagonista, RU486, em comparação as células somente tratadas com progesterona (ADAMTS 1 * $p=0,0435$ e ADAMTS 4 * $p=0,0466$). Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

Figura 19 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no meio condicionado da linhagem NIH-OVCAR-3. As amostras foram tratadas com o hormônio progesterona (P4) ou progesterona mais o antagonista RU486 e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. O antagonista foi eficiente somente para a protease ADAMTS 1 (* $p=0,0441$) (A e C), onde mostrou diminuição da expressão proteica da protease em relação as células tratadas somente com progesterona. Não houve diferenças para a ADAMTS 4 (A e D). A imagem B representa a membrana de nitrocelulose corada pelo corante de Ponceau utilizada como controle de carregamento. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

No lisado celular da linhagem ES-2 é possível notar que a influência da progesterona sobre o aumento na expressão proteica da proteases ADAMTS 1 e 4 em relação ao controle se mantêm (ADAMTS 1 $*p=0,0206$ e ADAMTS 4 $*p=0,0405$) (Figura 20, A, B, C e D). O tratamento com progesterona e o antagonista, RU486, teve uma tendência a diminuir os níveis de ADAMTS 1 ($p=0,0605$) (Figura 23, A e B), enquanto que reduziu de forma efetiva os níveis de ADAMTS 4 no lisado da linhagem ES-2 ($*p=0,0101$) (Figura 20, C e D).

No meio condicionado da linhagem ES-2 observamos que a progesterona leva a um aumento na expressão de ADAMTS 1 e 4 em relação ao controle (ADAMTS 1 $p=0,0586$ e ADAMTS 4 $*p=0,0363$) (Figura 21, A, C e D), entretanto o tratamento com o antagonista, RU486, foi ineficaz em reduzir os níveis das proteases ADAMTS 1 (Figura 21, A e C) e 4 (Figura 21, A e D).

Figura 20 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem ES-2. As amostras foram tratadas com o hormônio progesterona (P4) ou progesterona (P4) mais o antagonista RU486 e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. O tratamento com a progesterona elevou os níveis de ADAMTS 1 e 4 em relação ao controle (ADAMTS 1 * $p=0,0206$ e ADAMTS 4 * $p=0,0405$) (A – D). O tratamento com progesterona e o antagonista, RU486, induziu uma tendência à diminuição nos níveis de ADAMTS 1 ($p=0,0605$) em relação a amostra tratada somente com progesterona (A e B), enquanto que reduziu de forma efetiva os níveis de ADAMTS 4 (* $p=0,0101$) em relação as amostras tratadas somente com progesterona (C e D). Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

Figura 21 - Efeito do antagonista de PR (RU486) nos níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no meio condicionado da linhagem ES-2. As amostras foram tratadas com o hormônio progesterona (P4) ou progesterona (P4) mais o antagonista RU486 e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. O tratamento com progesterona elevou os níveis de ADAMTS 4 em relação a amostra controle (* $p=0,0363$). O tratamento com o antagonista, RU486, foi ineficaz em reduzir os níveis das proteases ADAMTS 1 (A e C) e 4 (A e D). A imagem B representa a membrana de nitrocelulose corada pelo corante de Ponceau utilizada como controle de carregamento. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

4.6 Efeitos dos hormônios sexuais na localização de ADAMTS 1 e 4

Para determinar se o tratamento hormonal seria capaz de levar a alterações na localização das proteases ADAMTS 1 e 4 nas linhagens de câncer de ovário analisadas, foi feita a técnica de imunofluorescência indireta.

A Imunofluorescência revelou que o tratamento com os hormônios não altera a localização das proteases ADAMTS 1 e 4 entre os grupos controle e tratado (resultados não mostrados). Entretanto é possível evidenciar que a imunolocalização da protease ADAMTS 1 é diferente da ADAMTS 4 em ambas as linhagens de câncer de ovário. Observamos que, enquanto a ADAMTS 1 está presente de forma mais marcante no núcleo, a ADAMTS 4 apresenta uma imunomarcção mais difusa, aparecendo em todo o citoplasma e núcleo celular (Figura 22, A e B).

Figura 22 - Imunolocalização de ADAMTS 1 e 4 nas linhagens celulares NIH-OVCAR-3 e ES-2. ADAMTS 1 apresenta uma marcação mais presente no núcleo tanto na linhagem NIH-OVCAR-3 (A) como na linhagem ES-2 (B), enquanto que ADAMTS 4 se mostra dispersa em todos os compartimentos celulares de ambas as linhagens (A e B). Verde- faloidina, Vermelho- ADAMTS 1 ou 4 e Azul- Núcleo. As setas (→) apontam a co-localização do vermelho de ADAMTS 1 com o azul do núcleo que, são vistas em rosa na coluna “Sobreposição”. Barra de escala: 5 μ M.

4.7 Efeitos da progesterona sobre a migração e invasão

Para avaliar se a progesterona estava envolvida com características pró-tumorigênicas como migração e invasão celular, foram realizados os ensaios de migração e invasão em câmara bipartite do tipo *Transwell*, e experimentos de migração através do ensaio de ferida.

A linhagem NIH-OVCAR-3 passou somente pelos ensaios de migração, uma vez que, por ser menos agressiva e mais diferenciada, não conseguiu digerir a camada de matrigel presente no ensaio de invasão em câmara bipartite do tipo *Transwell* (assim como ilustrado no material e métodos). Apesar das células dessa linhagem migrarem pouco, na análise do ensaio de migração em câmara bipartite, é possível observar que a progesterona levou a uma diminuição na capacidade de migração das células NIH-OVCAR-3 em relação ao controle (* $p=0,0247$) (Figura 23, A). Já na análise da migração através do ensaio de ferida é possível observar que a progesterona mantém a capacidade em reduzir a atividade migratória das células, entretanto a utilização do antagonista, RU486, não foi capaz de reverter este quadro (Figura 24, A e B).

Na análise do ensaio de invasão em câmara bipartite, realizado com a linhagem celular ES-2, observamos que a progesterona foi capaz de reduzir a invasão desta linhagem em relação ao controle (** $p=0,0075$) (Figura 23, B, C e D). Já na avaliação da capacidade migratória pelo ensaio de ferida, é possível notar que, assim como visto no ensaio de invasão, a progesterona foi capaz de reduzir a migração celular em relação ao controle (* $p=0,0188$), entretanto a utilização do antagonista, RU486, não foi capaz de reverter este quadro (* $p=0,0162$) (Figura 25, A e B).

Figura 23 - Progesterona diminui a migração e invasão da linhagem NIH-OVCAR-3 e ES-2, respectivamente. As amostras foram tratadas com o hormônio progesterona (P4) e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. Em relação ao controle o tratamento com a progesterona induziu uma diminuição tanto na migração ($*p=0,0247$) da linhagem NIH-OVCAR-3 (A), como na invasão ($*p=0,0075$) da linhagem ES-2 (B, C e D). Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$. Barra de escala: 100 μ M.

Figura 24 - Análise da migração da linhagem NIH-OVCAR-3 pelo ensaio de ferida.

As amostras foram tratadas com o hormônio progesterona (P4) ou progesterona mais o antagonista RU486 e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. O tratamento com a progesterona induziu uma diminuição na migração (* $p=0,0306$) em relação ao controle, entretanto o tratamento com o inibidor, RU486, levou a um pequeno aumento na migração em relação as células tratadas somente com progesterona ($p=0,2665$). Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$. Barra de escala: 100 μ M.

Figura 25 - Análise da migração da linhagem ES-2 pelo ensaio de ferida. As amostras foram tratadas com o hormônio progesterona (P4) ou progesterona (P4) mais o antagonista RU486 e a amostra controle (C) não recebeu tratamento com hormônio, por 24 horas. O tratamento com a progesterona induziu uma diminuição na migração (* $p=0,0188$) em relação ao controle, mas o tratamento com o inibidor, RU486, não reverteu o quadro. Os valores foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$. Barra de escala: 100 μ M.

4.8 Síntese dos resultados obtidos

A síntese dos resultados de parte dos experimentos realizados é demonstrada na figura 26. Podemos observar que a progesterona foi eficaz em elevar os níveis proteicos de ADAMTS 1 e 4 no lisado da linhagem NIH-OVCAR-3 e que levou ao aumento gênico e proteico de ambas as proteases na linhagem ES-2. Além disso, a progesterona reduziu a migração na linhagem NIH-OVCAR-3 e a invasão e migração na linhagem ES-2.

	mRNA						Proteína (Lisado celular *)						Migração/ Invasão
	E2		P4		DHT		E2		P4		DHT		P4
	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4	
NIH-OVCAR-3	-	-	-	-	-	↓	-	-	↑	↑	-	-	↓
ES-2	↓	↓	↑	↑	↓	↓	-	-	↑	↑	-	-	↓

Figura 26 - Síntese dos resultados obtidos. Na figura o número 1 representa a protease ADAMTS 1 e o número 4 representa a protease ADAMTS 4. A imagem “-” representa que não houve diferenças entre o tratamento e as células controle. A imagem “↑” representa que houve aumento nos níveis das proteases em relação ao controle. A imagem “↓” representa que houve diminuição nos níveis das proteases em relação ao controle. *Foi demonstrado apenas os resultados de lisado celular para a análise dos níveis proteicos. No meio condicionado só houve diferenças entre o tratamento com testosterona, que levou aumento na protease de ADAMTS 4 em relação às células controle na linhagem ES-2.

5 DISCUSSÃO

A remodelação proteolítica das proteínas da superfície celular e da MEC é crucial para processos biológicos como a embriogênese, cicatrização de feridas e ovulação. Entretanto, a remodelação da MEC excessiva ou descontrolada podem ser características de patologias como a artrite reumatoide e o câncer (COX; ERLER, 2011; SHINDO et al., 2000;). Essa remodelação é ocasionada por proteases responsáveis pela clivagem dos componentes da MEC, e dentre estas estão as ADAMTSs. Neste estudo observamos que ADAMTS 1 está aumentada na linhagem tumoral de ovário menos diferenciada, ES-2, quando comparada com a linhagem NIH-OVCAR-3, tanto no lisado celular como no meio condicionado. No Western Blot do meio condicionado foi possível evidenciar duas bandas, uma de 65 kDa, que corresponde a protease ADAMTS 1 sem o pró-domínio e com deleção proteolítica das duas ultimas repetições de TSP, e outra banda de 110 kDa que corresponde a protease ADAMTS 1 sem sofrer nenhum tipo de clivagem. Foi evidenciado de forma estatisticamente significativa um aumento de ADAMTS 1 com peso molecular de 110 kDa no meio condicionado da linhagem ES-2 em comparação a NIH-OVCAR-3. Conforme já descrito na literatura a ADAMTS 1 tem atividade pró-tumoral quando apresenta clivagem do pró-domínio, expondo o domínio ativo metaloproteinase, e os fragmentos que não possuem o domínio catalítico apresentam atividade anti-tumoral (LIU; XU; YU, 2006). Como constatado em nossos experimentos a linhagem mais agressiva, ES-2, apresenta maior expressão proteica de ADAMTS 1 com 110 kDa, o qual aumenta a taxa de proliferação de células tumorais e acelera o desenvolvimento do tumor pela presença de um domínio metaloproteinase ativo (ROCKS et al., 2008). Além disso, a expressão de ADAMTS 1 já mostrou estar associado com um fenótipo mais agressivo em células do endométrio humano (WEN, 2010).

ADAMTS 4 está aumentada no lisado celular da linhagem mais diferenciada, NIH-OVCAR-3, em relação a ES-2. Fisiologicamente, ADAMTS 4 é induzida seletivamente nas células da teca após a administração de hCG, isso sugere que esta protease pode participar na cascata proteolítica, pelo qual os componentes da lâmina basal são degradados antes da ovulação e luteinização (RICHARDS et al., 2005). Usando um modelo de implante de

tumor de melanoma de rato singênico, foi demonstrado que ADAMTS 4 com clivagem do pró-domínio, o qual possui seu domínio metaloproteinase ativo, foi capaz de promover o crescimento do câncer. Em contraste, as regiões C-terminais auxiliares e a proteína com ausência do domínio metaloproteinase inibiram o crescimento do tumor (RAO et al., 2013). Assim, ADAMTS 4 possui propriedades semelhantes a ADAMTS 1, uma vez que age de forma pro e antitumorigênica. Entretanto são necessárias investigações adicionais para esclarecer a contribuição deste metaloproteinase no câncer de ovário humano.

Com relação às ADAMTS 1 e 4 na linhagem menos agressiva, NIH-OVCAR-3, foi demonstrado que apesar de não haver alteração na expressão gênica, a progesterona foi capaz de induzir aumento na expressão proteica das proteases estudadas, tanto no lisado celular como no meio condicionado, em relação ao controle. Já no estudo da linhagem mais agressiva, ES-2, observou-se que a progesterona também foi eficaz, não somente no aumento da expressão proteica das ADAMTS 1 e 4 no lisado celular, como também levou a um aumento da expressão gênica das proteases analisadas, em relação ao controle. Além disso, foi demonstrado que a utilização do antagonista do receptor de progesterona, o RU486, foi eficaz em reduzir os níveis de ADAMTS 1 e 4 no lisado e meio condicionado das células NIH-OVCAR-3, e lisado das células ES-2 tratadas com progesterona, demonstrando que é a ativação do PR que leva ao aumento gênico e proteico dessas proteases nas linhagens de câncer de ovário estudadas.

Já foi demonstrado que a progesterona foi o mais potente regulador da expressão de genes de ADAMTS. Além de ADAMTS 1, a progesterona também regulou a expressão de ADAMTS 8 e 9 em células do estroma do endométrio humano normal (WEN, 2010). A progesterona se liga aos seus receptores, presentes sobre as células da granulosa, resultando no aumento de ADAMTS 1 (DOYLE et al., 2004; OHNISHI et al., 2005). Nos distúrbios em que há alterações no PR, o qual controla a expressão de ADAMTS 1, a ovulação não ocorre com sucesso e há redução nas taxas de fertilidade (SHIMADA et al., 2004), sugerindo que a transativação deste gene é mediada, pelo menos em parte, por PR. Foi demonstrado que os efeitos do LH e do PR sobre a

regulação de ADAMTS 1 no ovário ocorre separadamente, entretanto eles atuam de forma cooperativa para induzir a expressão máxima do gene de ADAMTS 1, tanto *in vivo* como em cultura celular. O gene de ADAMTS 1 não possui elemento responsivo à progesterona, a transcrição do gene de ADAMTS 1 por PR parece ser mediada indiretamente através de sua interação com os reguladores de transcrição C/EBP β , NF1-like factor e o Sp1/3. Como tal, PR parece desempenhar o papel de um coregulator induzível do gene da ADAMTS 1 em células da granulosa (DOYLE et al., 2004). ADAMTS 1 tem um papel crítico na degradação do versican, formação e expansão do cúmulos oócito, ovulação e angiogênese (OHNISHI et al., 2005). Outras proteases, como a ADAMTS 4, mostrou-se presente nas células granulosas de pequenos folículos ovarianos após tratamento com eCG para estimular o crescimento de folículos pré-ovulatórios e hCG para induzir a ovulação e luteinização, indicando que vários membros da família ADAMTS têm funções sobre a ovulação e formação do corpo lúteo exercendo efeitos específicos na formação, estabilização e função da matriz que rodeia e protege o ovócito (RICHARDS et al., 2005). Entretanto a manutenção dessa característica em células de câncer de ovário está sendo demonstrada pela primeira vez.

Como já dito, tanto ADAMTS 1 como ADAMTS 4 são proteases que apresentam funções diferentes de acordo com a conformação de sua molécula, tendo atividade pró-tumoral quando apresentam clivagem no pró-domínio, expondo o domínio ativo metaloproteinase, e atividade anti-tumoral quando fragmentadas. Desta forma o papel destas proteases no câncer é contraditório. Já foi demonstrado que ADAMTS 1 inibiu a angiogênese, independentemente da sua atividade proteolítica, em modelos *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que esta protease induz a apoptose das células endoteliais (OBIKA et al., 2012). Dados do nosso laboratório mostram que em tumores mais agressivos de mama, existe uma diminuição nos níveis de ADAMTS 1 quando comparados ao tecido normal (FREITAS et al., 2013). Por outro lado, ADAMTS 1 está aumentada em câncer de pâncreas e está envolvida na progressão tumoral facilitando a invasão local e metástase através dos linfonodos (CAL; LÓPEZ-OTÍN, 2015; MASUI et al., 2001). Além disso, estudos recentes demonstraram que a maior expressão de ADAMTS 1 em modelo de fibrossarcoma aumenta a taxa de

crescimento do tumor independente da angiogênese (CASAL et al., 2010). Já em relação à ADAMTS 4, já foi demonstrado que esta protease é expressa por células endoteliais e liga-se ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), levando a inibição da angiogênese e regressão do câncer (HSU et al., 2012). Em contra partida ADAMTS 4 tem a expressão proteica aumentada em tumores cerebrais e é capaz de degradar componentes da matriz extracelular, como o brevican e, por conseguinte, contribui para um potencial mais invasivo das células cancerosas (HELD-FEINDT et al., 2006). Nos nossos experimentos foi demonstrado que além de ter influência sobre os níveis gênicos e proteicos das ADAMTSs nas linhagens de câncer estudadas, a progesterona mostrou reduzir a capacidade migratória e invasiva das células NIH-OVCAR-3 e ES-2 quando comparada as células controle. Estudos mostraram que ADAMTS 1 e 4 são capazes de se ligar ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HSU et al., 2012; IRUELA-ARISPE; CARPIZO; LUQUE, 2003). A matriz extracelular enriquecida por ADAMTS 1 ou 4 acaba por sequestrar o fator de crescimento VEGF, impedindo que este se ligue ao seu receptor presente na célula levando a diminuição nas taxas de migração e invasão celular (FREITAS et al., 2013; HSU et al., 2012). A progesterona poderia estar induzindo a diminuição da migração e invasão celular pelo aumento na expressão de ADAMTS 1 e 4, entretanto mais estudos são necessários para se confirmar esta hipótese.

Ainda em relação ao papel da progesterona na diminuição da invasão e migração das linhagens celulares de câncer de ovário, já foi observado que a progesterona reduz a migração de mastócitos humanos (BELOT et al., 2007). Também já foi estudado a capacidade da progesterona em reduzir, em níveis fisiológicos (5-500 nM), a migração das células da linhagem HUVEC. Este efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista do receptor de progesterona, RU486, sugerindo que a inibição da migração induzida pela progesterona na HUVEC ocorre através da via de sinalização mediada por PR (LEE et al., 2015). Nos experimentos realizados foi demonstrado que o antagonista de PR, RU486, não foi capaz de reverter a diminuição na taxa de migração em relação às células tratadas somente com progesterona em ambas as linhagens analisadas, porém de forma mais marcante na linhagem mais

agressiva de câncer de ovário, ES-2. Acredita-se que isso tenha ocorrido uma vez que esta linhagem expressa somente receptores de membrana para a progesterona (m-PR) (CHARLES; THOMAS; LANGE, 2010), entretanto o RU486 é um antagonista clinicamente importante do receptor nuclear da progesterona (n-PR) (SARKAR, 2002). No entanto, a maior parte dos efeitos protetores da progesterona são mediados pelo n-PR, os quais se perdem progressivamente com o aumento do grau de malignidade do câncer de ovário (AKAHIRA et al., 2002), assim como ocorre com a ES-2.

Foi demonstrado por imunofluorescência que ADAMTS 1 está presente no núcleo das células analisadas, enquanto que ADAMTS 4 se apresenta difusa por todo núcleo e citoplasma celular. A localização nuclear de ADAMTS 1 não foi influenciada pelo tratamento hormonal, sendo que esta se apresentou no núcleo mesmo nas células controle. Ainda não há em literatura a constatação da presença de membros da família ADAMTS dentro do núcleo. Um estudo que demonstrou que MMP-2 está presente no núcleo de células do coração e fígado, e foi localizada dentro do núcleo de miócitos cardíacos, e que MMP-3 e TIMP-1 são também presentes no núcleo (SI-YAYEB et al., 2003). Em outro estudo, viu-se que a MMP-3 está localizada no núcleo, e está intimamente relacionada com o processo apoptótico das células.

Conclui-se que a progesterona foi o hormônio mais eficiente no aumento dos níveis de proteínas e expressão de genes das proteases ADAMTS1 e 4 em células de câncer de ovário, é que este aumento foi revertido com a utilização do antagonista do PR, RU486, demonstrando que é a ativação deste receptor que está envolvido com a maior expressão dessas proteases. A progesterona ainda foi capaz de influenciar no processo de migração e invasão celular de NIH-OVCAR-3 e ES-2. Além disso, ADAMTS 1 foi observada no núcleo de ambas as linhagens analisadas, o que indica uma possível função desta protease neste compartimento celular. Para invadir tecidos vizinhos e órgãos à distância, as células tumorais devem migrar e romper barreiras. Nesse trabalho observamos que a progesterona inibe esse processo de migração e invasão das células tumorais de ovário, e ao mesmo tempo aumenta os níveis da protease ADAMTS 1 e 4. Esses resultados são compatíveis com o que parte

da literatura mostra, afirmando que essas proteases podem ter um papel anti-tumorigênico, e no caso dos nossos resultados, induzido pelo hormônio progesterona.

Baseados nos resultados dos experimentos realizados concluímos que:

1. Os hormônios sexuais alteram os níveis de expressão de mRNA de ADAMTS 1 e 4 na linhagem câncer de ovário mais agressiva, ES-2, após 24 horas de tratamento. Em relação aos níveis proteicos, somente a progesterona foi capaz de aumentar os níveis das proteases ADAMTS 1 e 4 no lisado das linhagens, NIH-OVCAR-3 e ES-2, sendo que esta ação é inibida quando as células são tratadas com progesterona em conjunto com o antagonista do receptor de PR, RU486.
2. A localização da ADAMTS 1 é nuclear, enquanto que ADAMTS 4 está dispersa em todo núcleo e citoplasma celular de ambas as linhagens analisadas.
3. A progesterona foi capaz de diminuir a capacidade migratória e invasiva das células de câncer de ovário analisadas

REFERÊNCIAS¹

ADAMI, H. O. et al. Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. **Lancet**, v. 344, n. 8932, p. 1250-1254, Nov 1994.

ADAMI, H. O.; HUNTER, D.; TRICHOUPPOULOS, D. **Textbook of cancer epidemiology**. Oxford:Oxford University Press, 2008.784 p.

AKAHIRA, J. et al. Differential expression of progesterone receptor isoforms A and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 93, n. 7, p. 807-815, Jul 2002.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. New York:Garland Science,2002.1392 p.

APTE, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily - functions and mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 46, p. 31493-31497, Nov 2009.

ARRIBAS, J.; BECH-SERRA, J. J.; SANTIAGO-JOSEFAT, B. ADAMs, cell migration and cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, n. 1, p. 57-68, Mar 2006.

BAI, W. et al. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 36, n. 10, p. 657-666, 2000 Nov-Dec 2000.

BAIN, J. The many faces of testosterone. **Clin. Interv. Aging.**, v. 2, n. 4, p. 567-576, 2007.

BANKS, E.; BERAL, V.; REEVES, G. The epidemiology of epithelial ovarian cancer - a review. **Int. J. of Gynecol. Cancer**, v. 7, n. 6, p. 425-438, 1997.

BELOT, M. P. et al. Progesterone reduces the migration of mast cells toward the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 with an accompanying decrease in CXCR4 receptors. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 292, n. 5, p. 1410-1417, May 2007.

BERAL, V. et al. Ovarian cancer and oral contraceptives - collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. **Lancet**, v. 371, n. 9609, p. 303-314, Jan 2008.

¹De acordo com -

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023** - informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERRIER, A. L.; YAMADA, K. M. Cell-matrix adhesion. **J. Cell. Physiol.**, v. 213, n. 3, p. 565-573, Dec 2007.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-337, Nov 2004.

BROWN, H. M. et al. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice. **Biol. Reprod.**, v. 83, n. 4, p. 549-557, Oct 2010. I

_____. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. **Dev. Biol.**, v. 300, n. 2, p. 699-709, Dec 2006.

CAL, S.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAMTS proteases and cancer. **Matrix Biol.**, p. 350-357, Jan 2015.

CANALS, F. et al. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. 28-35, Apr 2006.

CANNISTRA, S. A. Cancer of the ovary. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 24, p. 2519-2529, Dec 2004.

CASAL, C. et al. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 11, p. 4676-4686, Jun 2010.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-312, Feb 2004.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases - cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 11, p. 37-43, Nov 2001.

CHARLES, N. J.; THOMAS, P.; LANGE, C. A. Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells - implications for progesterone-induced signaling events. **Horm. Cancer**, v. 1, n. 4, p. 167-176, Aug 2010.

CHEN, V. W. et al. Pathology and classification of ovarian tumors. **Cancer**, v. 97, n. 10 Suppl, p. 2631-2642, May 2003.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, n. 10, p. 1521-1533, Oct 2008.

CHIAFFARINO, F. et al. Breastfeeding and the risk of epithelial ovarian cancer in an Italian population. **Gynecol. Oncol.**, v. 98, n. 2, p. 304-308, Aug 2005.

CHOI, K. C. et al. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2351-2360, Jun 2001.

CHRISTIAN, L. M. The ADAM family - Insights into Notch proteolysis. **Fly (Austin)**, v. 6, n. 1, p. 30-34, 2012 Jan-Mar 2012.

CHRISTOFORI, G. New signals from the invasive front. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 444-50, May 2006.

COLLECTION, A. T. C. **ES-2 (ATCC® CRL-1978™)**. 2014a. **NIH - OVCAR-3 [OVCAR3] (ATCC® HTB-161™)**. 2014b. Disponível em: <<http://www.atcc.org/>>. Acesso em: 02 abril 2015.

COUSE, J. F.; HEWITT, S. C.; KORACH, K. S. **Steroid receptor in the ovary and uterus**. In: Knobil, E.; Neill, J.. Physiology of Reproduction . 3. ed. New York: Academic Press, 2006. 593-658 p.

COX, T. R.; ERLER, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix - implications for fibrotic diseases and cancer. **Dis. Model. Mech.**, v. 4, n. 2, p. 165-178, Mar 2011.

DAVEY, R. A.; MORRIS, H. A. Effects of estradiol and dihydrotestosterone on osteoblast gene expression in ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 23, n. 3, p. 212-218, 2005.

DEMIRCAN, K. et al. Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer. **Head Neck**, v. 31, n. 6, p. 793-801, Jun 2009.

DEVY, L. et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. **FASEB J.**, v. 16, n. 2, p. 147-154, Feb 2002.

DIEP, C. H. et al. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 54, n. 2, p. R31-R53, Apr 2015. ISSN 1479-6813.

DIZON, D. S. et al. Ovarian cancer associated with testosterone supplementation in a female-to-male transsexual patient. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 62, n. 4, p. 226-228, 2006. I

DOMCKE, S. et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 2126, 2013.

DOYLE, K. M. et al. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. **Mol. Endocrinol.**, v. 18, n. 10, p. 2463-2478, Oct 2004.

EDMONDSON, R. J.; MONAGHAN, J. M. The epidemiology of ovarian cancer. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 11, n. 6, p. 423-439, 2001 Nov-Dec 2001.

EDMONDSON, R. J.; MONAGHAN, J. M.; DAVIES, B. R. The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. **Br. J. Cancer**, v. 86, n. 6, p. 879-885, Mar 2002.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol. Aspects Med.**, v. 29, n. 5, p. 258-289, Oct 2008.

EL-ALFY, M. et al. Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1481-1491, Mar 1999.

ESPEY, L. L. et al. Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. **Biol. Reprod.**, v. 62, n. 4, p. 1090-1095, Apr 2000.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J. Cell. Sci.**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195-4200, Dec 2010.

FREITAS, V. M. et al. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. **Mol. Cancer**, v. 12, p. 230-241, 2013.

FUSHIMI, K. et al. Functional differences of the catalytic and non-catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 11, p. 6706-6716, Mar 2008.

GAMBACCIANI, M. et al. Hormone replacement therapy and endometrial, ovarian and colorectal cancer. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 17, n. 1, p. 139-147, Mar 2003.

GATES, M. A. et al. Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. **Am. J. Epidemiol.**, v. 171, n. 1, p. 45-53, Jan 2010.

GENDRON, C. et al. Proteolytic activities of human ADAMTS-5 - comparative studies with ADAMTS-4. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 25, p. 18294-18306, Jun 2007.

GERDES, M. J. et al. Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. **Front. Oncol.**, v. 4, p. 366, 2014.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, Oct 2003.

GORDON, M. S.; MENDELSON, D. S.; KATO, G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. **Int. J. Cancer.**, v. 126, n. 8, p. 1777-1787, Apr 2010.

GRASSO, G.; BONNET, S. Metal complexes and metalloproteases - targeting conformational diseases. **Metallomics**, v. 6, n. 8, p. 1346-1357, Jul 2014.

GREER, J. B. et al. Androgenic progestins in oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. **Obstet. Gynecol.**, v. 105, n. 4, p. 731-740, Apr 2005.

GREISER, C. M.; GREISER, E. M.; DÖREN, M. Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer - systematic review and meta-analysis. **Hum. Reprod. Update.**, v. 13, n. 5, p. 453-463, 2007 Sep-Oct 2007.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 810 p.

HALON, A. et al. Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 17, n. 3, p. 511-518, Sep 2011.

HAMILTON, T. C. et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH - OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. **Cancer Res.**, v. 43, n. 11, p. 5379-5389, Nov 1983.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000.

_____. Hallmarks of cancer - the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene - from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1187-1198, Jun 1996.

HASHIMOTO, T. et al. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. **Stroke**, v. 34, n. 4, p. 925-931, Apr 2003.

HAWKINS, S. M.; MATZUK, M. M. The menstrual cycle - basic biology. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1135, p. 10-18, 2008.

HELD-FEINDT, J. et al. Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. **Int. J. Cancer**, v. 118, n. 1, p. 55-61, Jan 2006.

HELZLSOUER, K. J. et al. Serum gonadotropins and steroid hormones and the development of ovarian cancer. **JAMA**, v. 274, n. 24, p. 1926-1930, Dec 1995.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, Oct 2000.

HO, S. M. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 1, p. 73, Oct 2003.

HSU, Y. P. et al. Anti-angiogenic properties of ADAMTS-4 in vitro. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 93, n. 1, p. 70-77, Feb 2012.

HUA, H. et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis - an evolving paradigm. **Cell .Mol. Life Sci.**, v. 68, n. 23, p. 3853-3868, Dec 2011.

HUIJBERS, I. J. et al. A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. 9808-9820, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124 p.

IRUELA-ARISPE, M. L.; CARPIZO, D.; LUQUE, A. ADAMTS1 - a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 995, p. 183-190, May 2003.

JANUCHOWSKI, R. et al. Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, p. 365-369, 2014.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **C.A. Cancer. J. Clin.**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011.

JEPPSSON, S.; RANNEVIK, G.; THORELL, J. I. Pituitary gonadotrophin secretion during the first weeks of pregnancy. **Acta.. Endocrinol. (Copenh)**, v. 85, n. 1, p. 177-188, May 1977.

JONES, R. D.; HUGH JONES, T.; CHANNER, K. S. The influence of testosterone upon vascular reactivity. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 151, n. 1, p. 29-37, Jul 2004.

JOSHI, P. A.; DI GRAPPA, M. A.; KHOKHA, R. Active allies - hormones, stem cells and the niche in adult mammapoiesis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 23, n. 6, p. 299-309, Jun 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2013. 556 p.

KALLURI, R. Basement membranes - structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, n. 6, p. 422-433, Jun 2003.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, May 2006.

KARAGIANNIS, E. D.; POPEL, A. S. Anti-angiogenic peptides identified in thrombospondin type I domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 359, n. 1, p. 63-69, Jul 2007.

KAUPPILA, S. et al. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. **J. Pathol.**, v. 186, n. 3, p. 262-268, Nov 1998.

KENNY, H. A. et al. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1367-1379, Apr 2008.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases - regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr 2010.

KUMAR, S.; RAO, N.; GE, R. Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer. **Cancers Basel**, v. 4, n. 4, p. 1252-1299, 2012.

KUNO, K. et al. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 1, p. 556-562, Jan 1997.

_____. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. **F.E.B.S .Lett.**, v. 478, n. 3, p. 241-245, Aug 2000.

KWOK, A. L. et al. Caution over use of ES2 as a model of ovarian clear cell carcinoma. **J. Clin. Pathol.**, v. 67, n. 10, p. 921-922, Oct 2014.

LABAT-ROBERT, J. Cell-Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. **Pathol. Biol.(Paris)**, v. 60, n. 1, p. 15-19, Feb 2012.

LACEY, J. V. et al. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. **JAMA**, v. 288, n. 3, p. 334-341, Jul 2002.

LE GOFF, C.; CORMIER-DAIRE, V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. **Hum Mol. Genet.**, v. 20, n. R2, p. 163-167, Oct 2011.

LEE, N. V. et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. **E.M.B.O. J.**, v. 25, n. 22, p. 5270-5283, Nov 2006.

LEE, P. et al. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 96, n. 3, p. 671-677, Mar 2005.

LEE, T. S. et al. Progesterone Inhibits Endothelial Cell Migration Through Suppression of the Rho Activity Mediated by cSrc Activation. **J. Cell. Biochem.**, v. 97, n. 4, p. 886-875, Mar 2015.

LENHARD, M. et al. Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer - progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival. **B.M.C. Cancer.**, v. 12, p. 553-559, 2012.

LILI, L. N. et al. Molecular profiling predicts the existence of two functionally distinct classes of ovarian cancer stroma. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 846-857, 2013.

LITWACK G.; TJ, S. **Manual de bioquímica com correlações clínicas.** São Paulo: Edgard Bliicher, 1998. 570 p.

LIU, Y. J.; XU, Y.; YU, Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. **Oncogene**, v. 25, n. 17, p. 2452-2467, Apr 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix - a dynamic niche in cancer progression. **J. Cell. Biol.**, v. 196, n. 4, p. 395-406, Feb 2012.

LUIZ, B. M. et al. Estudo epidemiológico de pacientes com tumor de ovário no município de Jundiaí no período de junho de 2001 a junho de 2006. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 55, p. 247-253 2009.

MAKIHIRA, S. et al. Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2480-2488, Jun 2003.

MASUI, T. et al. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, n. 11, p. 3437-3443, Nov 2001.

MATTHEWS, R. T. et al. Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 30, p. 22695-22703, Jul 2000.

MERDAD, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer - MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. **Anticancer Res.**, v. 34, n. 3, p. 1355-1366, Mar 2014.

MILES, R. R. et al. ADAMTS-1 - A cellular disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs is a target for parathyroid hormone in bone. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4533-4542, Dec 2000.

MINK, P. J. et al. Physical activity, waist-to-hip ratio, and other risk factors for ovarian cancer - a follow-up study of older women. **Epidemiology**, v. 7, n. 1, p. 38-45, Jan 1996.

MORLEY, J. E.; PERRY, H. M. Androgen treatment of male hypogonadism in older males. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 85, n. 2-5, p. 367-373, Jun 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759.

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta - identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Lett.**, v. 392, n. 1, p. 49-53, Aug 1996.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 11, p. 839-849, Nov 2004.

MØRCH, L. S. et al. Hormone therapy and ovarian cancer. **JAMA**, v. 302, n. 3, p. 298-305, Jul 2009.

NAGASE, H.; KASHIWAGI, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. **Arthritis Res. Ther**, v. 5, n. 2, p. 94-103, 2003.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, Jul 1999. ISSN 0021-9258.

NAITO, S. et al. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. **Pathol. Int.**, v. 57, n. 11, p. 703-711, Nov 2007.

NASSER, N. J. Heparanase involvement in physiology and disease. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 11, p. 1706-1715, Jun 2008.

NESS, R. B. Endometriosis and ovarian cancer - thoughts on shared pathophysiology. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 189, n. 1, p. 280-294, Jul 2003.

NIEWIAROWSKI, S. et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin. Hematol.**, v. 31, n. 4, p. 289-300, Oct 1994.

OBIKA, M. et al. Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. **Cancer Sci.**, v. 103, n. 10, p. 1889-1897, Oct 2012.

OHNISHI, J. et al. Functions for proteinases in the ovulatory process. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1751, n. 1, p. 95-109, Aug 2005.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, n. 3, p. 221-233, Mar 2007.

PARAMESWARAN, K. et al. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 44, n. 1, p. 139-146, 2006.

PARK, S. H. et al. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, n. 9, p. 2085-2098, Sep 2008.

PEARCE, C. L. et al. Increased ovarian cancer risk associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin. **Cancer**, v. 115, n. 3, p. 531-519, Feb 2009.

PETERS, H.; MCNATTY, K. P. **The ovary**. Barkeley e Los Angeles: University of California, 1980. 654 p.

PICTON, H. M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703-715, Dec 2008.

PORTER, S. et al. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem. J.**, v. 386, n. Pt 1, p. 15-27, Feb 2005.

_____. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 7, p. 2429-2440, Apr 2004.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family - surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet.**, v. 16, n. 2, p. 83-87, Feb 2000.

PRZEMYSŁAW, L. et al. ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. **BMB Rep**, v. 46, n. 3, p. 139-50, Mar 2013.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol**, v. 26, n. 8, p. 587-596, Oct 2007.

RAMACHANDRAN, B. E. A. Novel insights on imaging sex-hormone dependent 1 tumourigenesis in vivo. . **Endocr. Relat. Cancer**, p. 21-32, 2011.

RAO, N. et al. ADAMTS4 and its proteolytic fragments differentially affect melanoma growth and angiogenesis in mice. **Int. J. Cancer**, v. 133, n. 2, p. 294-306, Jul 2013.

RAYNAUD, C. M. et al. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 33, n. 4, p. 341-345, Aug 2010.

REHN, A. P. et al. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. **Bone**, v. 41, n. 2, p. 231-238, Aug 2007.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases - physiological and cellular functions. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 20, n. 2, p. 126-137, Apr 2009.

RICCI, M. D. et al. **Ginecologia oncológica - aspectos atuais do diagnóstico e tratamento**. Barueri: Manole, 2008. 357 p.

RICCIARDELLI, C. et al. The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. **Am. J. Pathol.**, v. 179, n. 6, p. 3075-3085, Dec 2011.

RICCIARDELLI, C.; RODGERS, R. J. Extracellular matrix of ovarian tumors. **Semin. Reprod. Med.**, v. 24, n. 4, p. 270-282, Sep 2006.

RICHARDS, J. S. et al. Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes - evidence for specific and redundant patterns during ovulation. **Biol. Reprod.**, v. 72, n. 5, p. 1241-1255, May 2005.

RIMAN, T. et al. Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer - results from a Swedish case-control study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 156, n. 4, p. 363-373, Aug 2002.

RIMAN, T.; NILSSON, S.; PERSSON, I. R. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 83, n. 9, p. 783-795, Sep 2004.

RISTOW, C. M.; YAMAMOTO, C. T.; FAVARO, M. Fatores de risco e patogênese das neoplasias malignas epiteliais de ovário - revisão de literatura. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, p. 185-195, 2006.

ROBKER, R. L. et al. Progesterone-regulated genes in the ovulation process - ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 9, p. 4689-4694, Apr 2000.

ROCKS, N. et al. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 369-379, Feb 2008.

_____. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. **Cancer Res.**, v. 68, n. 22, p. 9541-9550, Nov 2008.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; VAN WEZEL, I. L. Extracellular matrix in ovarian follicles. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 163, n. 1-2, p. 73-79, May 2000.

RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C. et al. Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. **Int. J. Biochem. Cell. Bio.**, v. 41, n. 4, p. 800-810, Apr 2009.

_____. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 293, n. 1, p. 501-508, Apr 2002.

ROMANO, A. et al. Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 101, n. 2, p. 287-295, May 2006.

ROZANOV, D. V. et al. Aberrant, persistent inclusion into lipid rafts limits the tumorigenic function of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignant cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 293, n. 1, p. 81-95, Feb 2004.

RUSSELL, D. L. et al. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 43, p. 42330-42335, Oct 2003.

SALANI, R. et al. Expression of extracellular matrix proteins in ovarian serous tumors. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 26, n. 2, p. 141-146, Apr 2007.

SANDY, J. D. et al. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 16, p. 13372-13378, Apr 2001.

SAPOZNIK, S. et al. Gonadotropin-regulated lymphangiogenesis in ovarian cancer is mediated by LEDGF-induced expression of VEGF-C. **Cancer Res.**, v. 69, n. 24, p. 9306-9314, Dec 2009.

SARKAR, N. N. The potential of mifepristone (RU486) as a female contraceptive drug. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 56, n. 2, p. 140-144, Mar 2002.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, n. 1-2, p. 53-65, Jul 2002.

SCHILDKRAUT, J. M. et al. Impact of progestin and estrogen potency in oral contraceptives on ovarian cancer risk. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 94, n. 1, p. 32-38, Jan 2002.

SCHOCK, H. et al. Early pregnancy sex steroids and maternal risk of epithelial ovarian cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 21, n. 6, p. 831-844, 2014.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases - multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev.**, v. 17, n. 1, p. 7-30, Jan 2003.

SHIMADA, M. et al. Down-regulated expression of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeats-1 by progesterone receptor antagonist is associated with impaired expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4603-4614, Oct 2004.

SHINDO, T. et al. ADAMTS-1 - a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 10, p. 1345-1352, May 2000.

SHOZU, M. et al. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 35, n. 2, p. 343-355, Oct 2005.

SI-YAYEB, K. et al. Unexpected localization of the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) within the cell nucleus in liver cancer cells. Mechanisms and consequences - **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 330-340, 2003.

SINHA-HIKIM, I. et al. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 8, p. 3024-3033, Aug 2006.

SONG, J. et al. Estradiol-induced ezrin overexpression in ovarian cancer - a new signaling domain for estrogen. **Cancer Lett.**, v. 220, n. 1, p. 57-65, Mar 2005.

STANTON, H. et al. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1812, n. 12, p. 1616-1629, Dec 2011.

SYED, V. et al. Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. **Cancer. Res.**, v. 61, n. 18, p. 6768-6776, Sep 2001.

TAN, I. E. A.; RICCIARDELLI, C.; RUSSELL, D. L. The metalloproteinase ADAMTS1 - a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. **Int. J. Cancer**, v. 133, n. 10, p. 2263-2276, Nov 2013.

TAUCHI, R. et al. The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. **J. Neuroinflamm.**, v. 9, p. 53, 2012.

TIVESTEN, A. et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, n. 11, p. 1833-1839, Nov 2004.

TORTORELLA, M. D. et al. Purification and cloning of aggrecanase-1 - a member of the ADAMTS family of proteins. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1664-1666, Jun 1999.

_____. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. **Curr. Pharm. Des.**, v. 15, n. 20, p. 2359-2374, 2009.

TUNG, K. H. et al. Reproductive factors and epithelial ovarian cancer risk by histologic type - a multiethnic case-control study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 158, n. 7, p. 629-638, Oct 2003.

TYAN, S. W. et al. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to secrete ADAMTS1 for cancer invasion through an epigenetic change. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35128, 2012.

VAN STAVEREN, W. C. et al. Human cancer cell lines - Experimental models for cancer cells in situ for cancer stem cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1795, n. 2, p. 92-103, Apr 2009.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v. 92, n. 8, p. 827-839, May 2003.

VOIGT, L. F. et al. Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. **Lancet**, v. 338, n. 8762, p. 274-277, Aug 1991.

VÁZQUEZ, F. et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 23349-23357, Aug 1999.

WANG, W. M. et al. Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 21, p. 19549-19557, May 2003.

WEEN, M. P.; OEHLER, M. K.; RICCIARDELLI, C. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, n. 2, p. 1009-10029, 2011.

WEN, J. Regulated expression of aggrecanases of adamts family in endometrial physiology and pathology. (Doctor of Philosophy - PhD). **Reproductive and Developmental Sciences**, University of British Columbia, p. 149, 2010.

WESTLING, J. et al. ADAMTS4 cleaves at the aggrecanase site (Glu373-Ala374) and secondarily at the matrix metalloproteinase site (Asn341-Phe342) in the aggrecan interglobular domain. **J Bio.l Chem.**, v. 277, n. 18, p. 16059-16066, May 2002.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. **Reprod. Sci.**, v. 14, n. 8 Suppl, p. 6-10, Dec 2007.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F.; CURRIE, A. R. Cell death - the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.