UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MARINA TROMBETTA LIMA

Isolamento, expressão, e caracterização de três variantes de *splicing* do gene supressor de tumor *RECK* em modelo de astrocitoma humano

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito da Versão Original na SPG:
21/02/2014

MARINA TROMBETTA LIMA

Isolamento, expressão, e caracterização de três variantes de *splicing* do gene supressor de tumor *RECK* em modelo de astrocitoma humano

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lima, Marina Trombetta
L732i Isolamento, expressão, e caracterização de três variantes de *splicing* do gene supressor de tumor *RECK* em modelo de astrocitoma humano / Marina Trombetta Lima. -- São Paulo, 2014.
205p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Biquímica.
Orientador: Sogayar, Mari Cleide

1. Biologia molecular 2. Expressão gênica 3. Neoplasias cerebrais I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD

À Gioconda Monaco Trombetta,

minha inspiração

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, pelos anos de orientação e discussões cientificas. Por ter sido responsável por minha formação profissional e contribuído de maneira imensurável para meu crescimento pessoal. Por todas as oportunidades e responsabilidades em mim depositadas. Por em todos os momentos demonstrar uma grande força que é o pilar de nosso grupo de pesquisa.

À Profa. Dra. Sheila Winnischofer, pela co-orientação informal deste trabalho e colaboração ativa. Por ter me ensinado desde do primeiro dia de trabalho o que é a ciência e o que significa ser uma pesquisadora. Por todas as discussões estimulantes e por ter me tornado uma pesquisadora e pessoa melhor. Por todos os momentos compartilhados alegres e tristes. Pela amizade e carinho.

Ao Prof. William Stetler-Stevenson do National Cancer Institute, NIH, pela oportunidade a mim concedida e orientação durante o estágio de doutorado sanduíche nos EUA. Por me aceitar em seu laboratório e por permitir que eu fizesse parte de um dos mais consagrados grupos de pesquisa em matriz extracelular. Pelas discussões estimulantes e um período de intenso aprendizado. Por ser um exemplo de pesquisador.
I am much obliged to PhD MD William Stetler-Stevenson for accepting me in his laboratory and for allowing me to be in one of the most recognized groups in cancer research. For giving me the opportunity to learn so much, and get in touch with excellent professionals. For being an outstanding scientist.

À Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie e à Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo, da Faculdade de Medicina da USP, por tornar esse estudo possível fornecendo as amostras de pacientes. Pelas importantes e produtivas colaborações.

À Profa. Dra. Lídia Amorim da UFF, por muito ter me ensinado, pela importante colaboração e discussões estimulantes.

Ao Prof. Robson Monteiro da UFRJ, e suas alunas Tatiana Lobo e Angélica Dutra, pelas colaborações produtivas e exemplo de objetividade cientifica.

À Profa. Dra. Mirian Hayashi da UNIFESP, pela colaboração estimulante.

Aos membros do laboratórios do Prof. William StetlerStevenson. À Dra. Liliana Guedez, por toda a ajuda dentro e fora do laboratório, pela amizade. À Beiyang Wei, por todo o auxilio com os experimentos. À Dra.Sandra-Jensen-Taubman, e à Dra. Laurie Shuman Moss, por toda a ajuda em especial com o modelo animal. À Dra.Huiying Han e à Dra. Dimitra Bourmpoulia por toda a ajuda. À todos por terem muito me ensinado e tornado essa experiência inesquecível.

Aos membros do laboratório da Profa. Sheila Winnischofer, meus “irmãos” cientíicos, Thiago Jacomasso, Juliana Kenski, Fernanda Barbosa e Cirstiane Zuconelli, por compartilharem minha paixão pela ciência e nosso alvo de estudo.

À Rita Figuera pela supervisão durante a iniciação cienteifica, pelos seus ensinamentos e amizade.

À Heloisa N. Nogueria, Michelle S. Konig, Thais de A. Ribas, Caio V. C. Dalmasso, e Tatiene Garcia, alunos queridos que tive o privilégio de supervisionar, mesmo que por um curto período, e de quem muito me orgulho. Por tudo que me ensinaram e me ensinam diariamente.

Ao Dr Christian Colin por toda a contribuição para este trabalho, conversas, conselhos e amizade.

À Camila Leal pela amizade, apoio e colaboração inestimáveis.

Aos antigos membros do laboratório, Fernanda Festa, Wagner, Antero, André Fujita, Angelita, Miguel, Flávia, Carin, Ícaro, Patrícia Barros, Dona Helena, entre tantos outros. Muito obrigada pelo incentivo, troca de conhecimentos e pelo convívio.

À Mayara Ribeiro e Nicole Caravello, por serem mais do que colegas de laboratório, amigas queridas de quem sinto muita falta.

À Dra. Maria Fernanda Forni, Nanda, essencial para a finalização deste trabalho, por ser uma irmã para mim e pesquisadora impecável que muito admiro. Pelos momentos compartilhados, risadas e lágrimas.

À Tatiane Maldonado, por seu humor e animação, pela amizade e companheirismo.

À Letícia Terra, Ana Lúcia Campanha e Gustavo G. Belchior, os três mosqueteiros, pela amizade sincera e despreocupada, pelas risadas. Por toda a ajuda nesse período.

À Profa. Katúúcia Paiva, Luiz, Rosángela, Anceli, Talita, e Profa. Dra. Leticia Labriola, por toda a ajuda e amizade.

À Aline Lobba, pela amizade e companheirismo, por ter sido essencial para a finalização dessa tese e me apoiado sempre.

À Luciana Gomes por ter sido minha companheira nessa jornada cieníífica desde o inicio.

À Roberta Mourão, Marluce Mantovane, pela amizade, brincadeiras e sermões. Amigas muito queridas. À Erika Molina, exemplo de cientista e amiga para todas as horas.

Aos meus grandes amigos do laboratório: Ilana, Patricia Kossugue, Fernando, Túlio, Raquel, Carlos, Adauto, Gabriel, Ana Paula, Theri eTalita.

À Dra. Ana Cláudia Carreira pelo papel essencial que desempenhou neste projeto e amizade.À Mariele, Camila e Ingride pela ajuda importantíssima nesse período.

Ao Dr. Renato Assorino pela ajuda crucial com os vetores e amizade.

Ao Dr. Marcos Demasi que tornou este projeto possível, pelos conselhos e amizade.

À Zizi, Débora, Sandra e Ricardo, por seu trabalho técnico, ajuda e amizade. Por viabilizarem o trabalho do grupo. Por compartilharem bons e maus momentos.

Aos funcionários da Química, por sua competência e profissionalismo.

Aos queridos amigos do curso de ciências moleculares, em especial da T14, por compartilharem momentos de grande aprendizado e união. Pela amizade. Ao Yul Otani, que sempre me incentivou e que me é um amigo muito querido.

Ao Ricardo por me ensinar o que é o amor, me apoioar no final dessa tese e me manter sã. Por tudo que significa para mim.

À minha famíiia que sempre me incentivou e acreditou em mim, que é responsável pela pessoa que sou hoje e a quem devo muito. Em especial a minhas tias queridas, Italia e Brigida, pelo carinho e apoio incondicional. Ao Luigi, Ana Lucia, Euripedes, Bete, Luis, Nina e Clara. Aos meus avós queridos que muito deixam saudades e que foram exemplos de caracter e carinho. A minha nona Gioconda por fazer de mim quem sou hoje.

À meu pai, Jacob, por todo o incentivo, amor, apoio e inspiração.

À minha querida irmã Lígia, por ser minha melhor amiga, por seu amor, companheirismo e apoio neste processo.

À minha mãe, Margherita, pelo amor incondicional, por sempre ter me apoiado e acreditado em mim, por possibilitar a realização de um sonho.

À todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para que este dia chegasse e para que este trabalho fosse concretizado.

À CAPES, e Associação Fulbright por financiar meu estágio no exterior, por meio da concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche.

À FAPESP pelo apoio financeiro a este projeto, e pelas bolsas de iniciação científica e doutorado, concedidas ao longo da minha formação.

Ao BNDES, FINEP, PRP-USP pelo apoio financeiro dos projetos do laboratório.

“ Cantar e cantar e cantar
a beleza de ser
um eterno aprendiz”
Gonzaguinha

RESUMO

Trombetta-Lima, M. **Isolamento, expressão e caracterização de três variantes de *splicing* do gene supressor de tumor *RECK* em modelo de astrocitoma humano**. 2014. 204 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Glioblastoma multiforme (GBM), ou astrocitoma grau IV, é o tumor mais comum e letal do sistema nervoso central. Uma de suas características mais marcantes é seu alto potencial invasivo do tecido normal adjacente. Neste processo, o remodelamento da matriz extracelular, modulado por enzimas que degradam seus componentes e por inibidores destas enzimas, é crucial. Foi descrito que a expressão de MMP-2 e MMP-9, membros da família das metaloproteinases de matriz, aumentam conforme a progressão de astrocitomas. A variante canônica de *RECK* suprime a invasão tumoral e metástase através da inibição da atividade de, pelo menos, três MMPs: MMP-2, MMP-9 e MMP-14. Uma correlação positiva tem sido observada entre a abundância da expressão de *RECK* em amostras tumorais e um prognóstico mais favorável para pacientes com diversos tipos de tumores. Neste estudo, variantes de *splicing* do gene supressor de tumor *RECK* foram identificadas através da análise de *Expressed sequenced Tags* (ESTs), isoladas por RT-PCR, sequenciadas e clonadas. Três novas variantes de *splicing* do gene *RECK* foram identificadas e caracterizadas. O perfil de expressão dos transcritos de *RECK* foi determinado através de ensaios de RT-PCR quantitativo em um painel de tecidos normais e, também, durante a progressão de astrocitomas. Foram utilizadas, para esta análise, amostras macro dissecadas de tumores de pacientes com astrocitomas grau I (n=15), II (n=15), III (n=15) e GBMs (n=30). Os resultados mostram que maior expressão de *RECK* canônico, acompanhada de maior razão de expressão da variante canônica em relação às variantes de *splicing* alternativo, correlaciona positivamente com maior sobrevida global de pacientes com GBM, sugerindo seu papel como potenciais biomarcadores para o prognóstico destes pacientes. Análise funcional das isoformas de RECK em células U87 MG revelou que as células superexpressando as isoformas não apresentam inibição do processo de

invasão celular, como observado para superexpressão da proteína canônica. Dentre as isoformas analisadas, destaca-se RECK-B, isoforma potencialmente ancorada à membrana plasmática por GPI, como a proteína canônica RECK, sugerindo uma possível colocalização destas variantes. Observa-se que células superexpressando RECK-B apresentam maior capacidade tumorigênica. Os resultados indicam que as variantes de *RECK* e o balanço entre a expressão destas variantes, apresentam um papel importante no comportamento e na agressividade de GBMs, tendo potencial valor na clínica. Além disso, para abrir perspectivas para o estudo das variantes de *RECK*, o balanço de expressão dos transcritos canônico e alternativos deste gene foi explorado durante os processos de diferenciação osteogênica e adipogênica. Os resultados indicam que a expressão da variante canônica é mais abundante em relação à expressão de suas isoformas em estágios tardios da adipogênese, sendo que o perfil inverso é observado em relação à isoforma *B* durante a osteogênese, sugerindo que o balanço entre os níveis de expressão das isformas de *RECK* possui um potencial papel biológico que deve ser explorado durante esses processos. Em conjunto, os resultados demonstram a existência de, pelo menos, três variantes de *splicing* do gene supressor de tumor *RECK* com envolvimento na tumorigênese e na diferenciação celular, abrindo novas perspectivas para o estudo e a aplicação do gene *RECK* na clínica.

Palavras-chave: RECK, *splicing*-alternativo, glioblastoma, matriz-extracelular, câncer, biomarcador

ABSTRACT

Trombetta-Lima, M. **Isolation, expression, and characterization of three alternatively spliced variants of the *RECK* tumor suppressor gene in the human astrocytoma model**. 2014. 204 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Glioblastoma multiforme (GBM) or grade IV astrocytoma is the most common and lethal tumor of the central nervous system. One of the most striking features of GBMs is their invasive potential of the normal surrounding brain tissue. It has been described that MMP-2 and MMP-9 expression levels increase during astrocytoma progression. Canonical *RECK* suppresses tumor invasion and metastasis by negatively regulating at least three matrix metalloproteinases, namely: MMP-9, MMP-2 and MT1-MMP. A positive correlation has been observed between the abundance of *RECK* expression in tumor samples and a more favorable prognosis for patients with several types of tumors. In this study, splice variants of the *RECK* tumor suppressor gene were identified by Expressed Sequence Tag (EST) analysis, isolated by RT-PCR, sequenced and cloned. Three novel alternatively spliced variants of the *RECK* tumor suppressor gene were identified and characterized. The *RECK* transcripts expression profiles were investigated using quantitative RT-PCR assays in a normal tissue RNA panel and, also, during astrocytoma progression in macrodissected tumor samples of patients with astrocytoma grades I (n=15), II (n=15), III (n=15) and IV/GBM (n=30). The results show that higher canonical *RECK* expression, accompanied by a higher ratio of canonical to alternative transcript expression, positively correlated with higher overall survival rate after chemotherapeutic treatment of GBM patients. Our findings suggest that these *RECK* transcript variants may potentially be used as biomarkers for prognosis of GBM patients. U87 MG cells overexpressing each *RECK* alternative variant were generated and found to lack the supressive role of cellular invasion processes found upon overexpressing the canonical protein. Among the characterized isoforms, RECK-B stands out, since this isoform is potentially anchored to the cell membrane by a GPI anchor, exactly as the canonical RECK and, also, since cells overexpressing RECK-B display greater tumorigenic capacity. The results indicate that *RECK* variants and the balance between the expressions of these variants, play an important role in the behavior and

aggressiviness of GBMs, therefore have a potential translational application. In addition, in order to investigate new perspectives for the analysis of these isoforms, the expression balance of RECK transcripts was assessed during osteogenesis and adipogenesis, by qRT-PCR. The results show that the expression of the canonical *RECK* variant is more abundant that that of its alternative isoforms in later stages of adipogenic differentiation. The opposite profile is found regarding *RECK-B* during osteogenesis, suggesting that the balance between the expressions of these transcripts may have a potential role during these processes. Taken together, the results show the existence of, at least, three alternatively spliced variants of the *RECK* tumor suppressor gene, which are involved in tumogigenesis and cellular differentiation, opening new perspectives for studies and clinical application of the *RECK* gene.

Keywords: RECK, alternative-splicing, glioblastoma, extracelular-matrix, cancer, biomarker

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	*American Type Culture Collection*
cDNA	DNA complementar
Ct	*Threshold cycle*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HMBS	Hidroximetil bilane sintase *(hydroxymethyl bilane synthase)*
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase
hRECK	RECK de humano
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MEC	Matriz extracellular
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
PBSA	Solução salina tamponada com fosfato – sem cálcio ou magnésio
PCR	Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo
RECK	*Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	*Reverse Transcription PCR*
SBR	Sistema de classificação *Scarff-Bloom-Richardson*

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	*SDS-Polyacrylamide Gel Eletroforesis*
SFB	Soro fetal bovino
SLD	Sobrevida Livre de Doença
TIMP	Inibidor tecidual de MMPs (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*)
Tm	Temperatura de *melting*
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
GBM	Glioblastoma Multiforme
SNC	Sistema Nervoso Central
WHO	*World Health Organization*
SPI	Inibidor de Serina Protease
EGF	*Epidermal Groth Factor*
ADAM	*A Disintegrin And Metalloprotease*
ESTa	*Expressed Sequence Tags*
BLAT	*BLAST-like Alignment Tool*
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*

SUMÁRIO

1. Introdução.....18

1.1 Câncer.....18
1.2 Gliomas.....20
1.3 A influência da Matriz Extracelular na progressão tumoral.....25
1.4 Gliomas e a matriz extracelular.....28
1.5 As metaloproteinases de matriz e seus inibidores.....29
1.6 O gene supressor de tumor *RECK*.....33
1.7 O remodelamento da MEC em astrocitomas.....37
1.8 Processamento de RNA e *Splicing* alternativo.....41

2. Objetivos..... 50

2.1. Objetivos geral 50

2.2. Objetivos específicos.....50

2.2.1. Identificação e caracterização das variantes de splicing alternativo do gene supressor de tumor RECK.....50
2.2.2.As variantes de splicing de RECK e seu envolvimento na biologia de astrocitomas.....51
2.2.3.Perfil de expressão das variantes de RECK durante os processos de diferenciação osteogência e adipogênica.....52

3. MATERIAIS E MÉTODOS 53

3.1. Soluções e meios de cultura.....53
3.2. Linhagens celulares.....53
3.3. Condições de cultura celular e manutenção.....56
3.4. Amostras de tecido.....58
3.5. Extração de RNA.....58
3.6. Amplificação por PCR e sequenciamento.....59
3.6.1. Amplificação por PCR.....59
3.6.2. Clonagem no vetor pGEM®-T Easy.....60
3.6.3. Reação de ligação.....61
3.6.4. Transformação bacteriana com DNA plasmideal.....61
3.6.4.1. Obtenção de bactérias eletrocompetentes.....61
3.6.4.2. Transformação bacteriana por eletroporação, estocagem e amplificação do DNA plasmideal.....62

3.6.5. Reação de sequenciamento pelo método de Sanger.....63
3.7. Clonagem em vetores plasmideais.....64
3.7.1. Vetores de expressão pLV.....64
3.7.2. Vetores de expressão TOPO cDNA 3.3.....66
3.8. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)……67
3.9. RT-PCR quantitativo.....68
3.9.1. Síntese de cDNA.....68
3.9.2. Desenho dos *primers*.....70
3.9.3. Determinação da concentração final de *primers*.....70
3.9.4. Determinação da eficiência dos *primers*.....72
3.9.5. Reação de RT-PCR quantitativo.....72
3.9.6. Confirmação da expressão diferencial.....73
3.10 Transfecção celular transitória.....75
3.11. Estabelecimento de linhagens de celulares estáveis de Glioblastoma humano superexpressando RECK, RECK-B, -D ou –I.....76
3.11.1. Vetores utilizados.....77
3.11.2. Produção viral.....77
3.11.3. Titulação viral.....78
3.11.4. Transdução celular por lentivírus.....79
3.11.4.1. Seleção da população transduzida através de Sorting em citometria de fluxo.....79
3.12. Curva de crescimento celular.....82
3.13. Ensaio de formação de colônia em meio semi-sólido (suspensão de agarose).....82
3.14. Ensaios de migração celular *in vitro*.....83
3.14.1. Ensaio de migração celular *in vitro* por Transwell.....83
3.14.2. Ensaio de migração celular *in vitro* por *scracthing (wound-healing)*.....84
3.15. Ensaio de invasão celular *in vitro*.....85
3.16. Zimografia.....85
3.17. Western Blot.....86
3.17.1. Obtenção de extratos protéicos totais.....86
3.17.2. Fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose..... 87
3.17.3. Imunoreação.....87
3.18. Indução da diferenciação osteogênica e adipogênica.....88
3.19. Análise estatística……89

4. RESULTADOS 90

4.1. Identificação e caracterização das variantes de splicing alternativo do gene supressor de tumor RECK.....90
4.1.1. Análise de etiquetas de sequências expressas (ESTs - Expressed Sequence Tags) e sequências de RNA não-referência para identificação de variantes de splicing de RECK 90
4.1.2. Amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento das variantes de Splicing de RECK.....93
4.1.3. Análise da sequência nucleotídica das variantes de *splicing* de RECK ..101
4.1.4. Análise da sequência polipeptídica predita para as isoformas de RECK e confirmação de sua expressão.....103
4.1.5. Perfil de expressão dos transcritos de RECK em painel de RNA de tecidos normais.....108
4.2. As variantes de splicing de RECK e seu envolvimento na biologia de astrocitomas.....111
4.2.1. Perfil de expressão dos transcritos de RECK, MMPs e TIMPs em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....112
4.2.2. Correlação entre os níveis de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....119
4.2.3. Correlação entre a expressão e o balanço dos níveis de expressão dos transcritos de RECK e a sobrevida global de pacientes com GBM.....121
4.2.4. Análise funcional das isoformas de RECK em linhagem de Glioblastoma Multiforme humano.....124
4.2.4.1 Estabelecimento de linhagens derivadas de U87 MG superexpressando cada uma das isoformas de RECK.....124
4.2.4.2. Análise da taxa de proliferação celular de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK.....126
4.2.4.3. Análise da capacidade migratória de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK.....128
4.2.4.4. Análise da capacidade invasiva de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK.....132
4.2.4.5. Análise da expressão de MMPs e TIMPs nas linhagens superexpressando as isoformas de RECK 134
4.2.4.6. Análise da atividade de MMP-2 e -9 nas linhagens superexpressando as isoformas de RECK.....136
4.2.4.7. Análise da capacidade tumorigênica das linhagens superexpressando as isoformas de RECK.....138
4.3. Perfil de expressão das variantes de RECK durante os processos de diferenciação osteogência e adipogênica.....139

4.3.1. Perfil de expressão de MMPs, TIMPs e variantes de RECK durante o processo de diferenciação osteogênica 140
4.3.2. Perfil de expressão de MMPs, TIMPs e variantes de RECK durante os processos de diferenciação adipogênica.....147

5. DISCUSSÂO 153

5.1. Identificação das variantes de *splicing* alternativo do gene supressor de tumor *RECK*.....154
5.2. Expressão das isoformas proteicas de RECK.....155
5.3. Perfil de expressão dos transcritos de RECK em painel de RNA de tecidos normais.....157
5.4. As variantes de splicing de RECK e seu envolvimento na biologia de astrocitomas.....158
5.4.1. Perfil de expressão dos transcritos de RECK, MMPs e TIMPs durate a progressão de astrocitomas e sua correlação com a sobrevida de pacientes com GBM.....159
5.4.2. Correlação entre a expressão e balanço dos valores de expressão relativa dos transcritos de RECK e sobrevida global de pacientes com GBM.....161
5.4.3. Análise funcional das isoformas de RECK em linhagem de Glioblastoma Multiforme humano..... 162
5.5. Envolvimento das variantes de RECK durante os processos de diferenciação osteogênica e adipogênica.....166

6. CONCLUSÕES 171

7. PERSPECTIVAS 173

8. REFERÊNCIAS..... 175

LISTA DE ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

1. Introdução

1.1. Câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*), 14 milhões de novos casos de câncer foram diagnósticos em 2012 e, em duas décadas, esse número deve aumentar para 22 milhões. No mesmo ano, o câncer foi a causa de 8,2 milhões de mortes, sendo que a América do Sul, América Central, África e Ásia juntas contabilizam mais de 60% dos novos casos anuais e 70% dos óbitos (Http://Www.Who.Int/En/, January 2014).

O câncer compreende um conjunto de neoplasias clinicamente heterogêneas que possuem, em comum, as características de: sinalização proliferativa autossustentável, evasão de sinais de parada do crescimento celular, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, atividade angiogênica, instabilidade genômica, potencial celular invasivo e metastático, entre outros (Hanahan e Weinberg, 2011). Neste contexto, destaca-se a importância da utilização de biomarcadores na clínica. Os biomarcadores podem ser divididos entre: marcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos. Os marcadores diagnósticos possibilitam uma classificação mais precisa do tumor; marcadores prognósticos permitem uma estimativa mais acurada das características intrínsecas do tumor, independentemente da terapia utilizada; e marcadores preditivos são informativos quanto à sensibilidade e possível resposta do paciente à determinada terapia. É importante ressaltar que, muitas vezes, essas subdivisões se sobrepõem (Tanaka, Louis *et al.*, 2013; Tanaka, Meyer *et al.*, 2013). Idealmente, um biomarcador deve fornecer informações sobre a resposta à terapia, de

modo a permitir a estratificação dos pacientes em grupos distintos para terapia mais adequada (Wang e Jiang, 2013).

Dentre potenciais biomarcadores para uso na clínica destaca-se o gene supressor de tumor *RECK* (*REversion-inducing Cystein-Rich protein with Kazal motifs*), alvo deste estudo, envolvido na modulação do remodelamento da matriz extracelular e, portanto, no potencial invasivo do tumor (Takahashi C, 1998). Foi demonstrado que *RECK* apresenta um valor prognóstico durante a progressão de vários tipos tumorais como hepatocarcinoma (Furumoto, Arii *et al.*, 2001), carcinoma pancreático (Masui, Doi *et al.*, 2003), carcinoma mamário humano (Span Pn, 2003), neoplasias de células renais (Rabien, Stephan *et al.*, 2013) e carcinoma de células não pequenas de pulmão (Takenaka, Ishikawa *et al.*, 2004; Takenaka, Ishikawa *et al.*, 2005). Porém, a via de atuação de *RECK* ainda não foi totalmente esclarecida. Este gene, que é caracterizado como sendo supressor de tumor e metástase, em alguns casos, apresenta perfil inverso àquele esperado, como, por exemplo, no caso da progressão de carcinomas mamários, no qual observa-se uma maior expressão de *RECK* nos tumores mais agressivos (Figueira, Gomes *et al.*, 2009; Gomes, Terra *et al.*, 2012).

Até o momento, todos os dados descritos para a ação de *RECK* são creditados a uma única isoforma, porém, sabe-se que a maioria dos mRNAs de genes eucarióticos sofrem um dinâmico processo de *splicing* capaz de promover elevada complexidade em relação à expressão gênica tanto em processos fisiológicos como patológicos. No presente trabalho, propõe-se a identificação e caracterização de variantes geradas por processamento alternativo do gene *RECK*, cujo envolvimento na via de atuação da forma canônica pode ajudar a esclarecer seu mecanismo de ação e contribuir para uma

aplicação mais precisa do potencial valor prognóstico deste gene. O modelo de estudo escolhido foi de glioblastoma multiforme (GBM), caracterizado por um alto potencial invasivo do tecido normal adjacente e pobre prognóstico (Louis, Ohgaki *et al.*, 2007).

1.2. Gliomas

Os gliomas são classificados de acordo com suas características morfológicas e histopatológicas em: astrocitomas (aproximadamente 67% dos casos), oligodendrogliomas e oligoastrocitomas (Kleihues, Burger *et al.*, 1993; Schwartzbaum, Fisher *et al.*, 2006; Louis, Ohgaki *et al.*, 2007).

Os astrocitomas são classificados, pela Organização Mundial de Saúde (WHO), em uma escala de I a IV, na qual o grau mais alto corresponde aos glioblastomas (GBM) (Kleihues, Burger *et al.*, 1993; Schwartzbaum, Fisher *et al.*, 2006; Louis, Ohgaki *et al.*, 2007; Ohgaki e Kleihues, 2007; Cunliffe, Fischer *et al.*, 2010).

Astrocitomas císticos ou pilocíticos, grau I: lesões com baixo potencial proliferativo e possibilidade de cura seguindo somente a ressecção cirúrgica;

Astrocitomas difusos, grau II: neoplasias de natureza infiltrativa, apesar de possuírem baixa atividade proliferativa, geralmente ocorrendo recidiva. Tumores de grau II têm uma tendência natural a progredir para maiores graus de malignidade;

Astrocitomas anaplásicos, grau III: lesões com evidências histológicas de malignidade, incluindo atipia nuclear e figuras mitóticas. Geralmente pacientes com tumores grau III recebem radiação e/ou quimioterapia adjuvante;

Glioblastoma multiforme, grau IV: neoplasias citologicamente malígnas, apresentam diversas figuras mitóticas, proliferação microvascular e áreas de necrose, tipicamente associadas à rápida evolução da doença, rápida recorrência e prognóstico pobre. Uma das características mais relevantes de GBMs é a potencialidade individual de suas células invadirem o tecido normal adjacente, tornando as margens do tumor difusas, e estabelecendo numerosas micrometastases, dificultando, assim, a cura total por ressecção.

Os GBMs são os tumores cerebrais mais comuns em adultos, cerca de 17% dos tumores intracranianos, apresentando um prognóstico sombrio, com sobrevida média após o diagnóstico menor que 12 meses. O tratamento padrão consiste em ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvantes. Foi descrito que fatores prognósticos independentes que influenciam na sobrevida global do paciente são: extensão da ressecção cirúrgica, dose de radiação aplicada e uso de terapia adjuvante (Ahmadloo, Kani *et al.*, 2013).

O objetivo da cirurgia para retirada do tumor é reduzir os sintomas, estabelecer um diagnóstico preciso através de análise histológica, e aumentar a eficácia da terapia. A natureza invasiva e difusa das células de GBM no parênquima cerebral adjacente leva à uma avaliação delicada para decisão da abordagem cirúrgica adotada, que deve pesar entre uma ressecção cirúrgica extensa, de modo a eliminar a maior número possível de células tumorais, e os efeitos adversos associados com a perda de função cerebral. Por um lado, foi demonstrado que uma extensa ressecção cirúrgica (com margens de ressecção a uma distância de 1 a 2 cm da margem do tumor) aumenta a eficácia de terapias adjuvantes subsequentes, aumentando a sobrevida global. Por

outro lado, o aumento do comprometimento de função cerebral é uma preocupação por levar à uma diminuição da qualidade de vida do paciente (Anton, Baehring *et al.*, 2012; Mrugala, 2013; Wang e Jiang, 2013). Dado que a recidiva ocorre na maioria dos casos dentro de 2 cm da margem do tumor primário, uma segunda cirurgia de ressecção pode ser necessária por diminuir a massa tumoral e manter os benefícios descritos anteriormente. (Wang e Jiang, 2013). As margens tumorais apresentam angiogênese intensa e as células tumorais nessa região apresentam grande capacidade migratória e resistência à apoptose, contribuindo para a resistência ao tratamento e recidiva (Wang e Jiang, 2013). Os astrocitomas de alto grau são tumores altamente vascularizados e apresentam expressão elevada de VEGF (*Vascular Endothelial Growtth Factor*), fator essencial para o estabelecimento da angiogênese. Uma perspectiva promissora na clínica é o uso de bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado recombinante anti-VEGF. Primeiro agente antiangiogênico que foi clinicamente aprovado para o tratamento do câncer, seu uso sozinho ou em combinação com irinotecan, leva a um aumento de 35-50% na sobrevida livre de doença para GBM (Kreisl, Kim *et al.*, 2009; Ahmadloo, Kani *et al.*, 2013; Wang e Jiang, 2013).

A Temozolomida (TMZ) é um derivado imidazotetrazina do agente alquilante dacarbazina, que sensibiliza as células tumorais à radiação, apresentando boa tolerância do organismo, quando comparado a agentes similares, e boa distribuição no sistema nervoso central (SNC), sendo utilizado, atualmente, no tratamento padrão de GBMs primários e secundários, assim como no tratamento de astrocitomas anaplásicos (Wang e Jiang, 2013). Seu uso foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1999 para o tratamento de GBM e astrocitomas anaplásicos no caso de recorrência

ou progressão após a terapia padrão. Em 2005, seu uso foi aprovado nos EUA e na União Europeia para pacientes adultos com GBM *de novo*, concomitantemente com a radioterapia, e, posteriormente, como tratamento de manutenção. Sua liberação se baseou nos resultados de um estudo clínico de fase III conduzido pela *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC), no qual a sobrevida global de dois anos mostrou aumento significativo quando do tratamento concomitante de TMZ e radioterapia (27%) quando comparado à radioterapia sozinha (10%). Neste estudo, TMZ foi administrada diariamente durante a radioterapia, e por cinco dias a cada quatro semanas, em um total de seis ciclos para tratamento de manutenção (adjuvante) após o final da radioterapia. Na clínica, a TMZ é administrada por até 12 ciclos se tolerado pelo paciente (Stupp, Van Den Bent *et al.*, 2005; Spiegel, Esrailian *et al.*, 2007; Mrugala, 2013; Tatar, Thivat *et al.*, 2013; Wang e Jiang, 2013)

Devido à grande heterogeneidade dos astrocitomas, a identificação e análise de biomarcadores se mostra importante para o estabelecimento de uma estratificação prognóstica, que auxiliaria na escolha da abordagem e estratégia de tratamento para cada paciente (Wang e Jiang, 2013). Atualmente, os biomarcadores mais proeminentes para astrocitomas são: (i) a mutação ou amplificação de (*EGFR Epidermal Growth Factor Receptor*); (ii) a mutação de *IDH1* e/ou *IDH2* (*Isocitrate Dehydrogenase*); (iii) co-deleção dos braços cromossômicos 1p/19q; (iv) e a metilação do promotor do gene de reparo *MGMT (O_6-methylguanine-DNA metiltransferase (Tanaka, Louis et al., 2013; Tanaka, Meyer et al., 2013).* A relevância e os valores prognósticos destes biomarcadores estão resumidos na Tabela 1.

Marcador	Diagnóstico	Prognóstico	Preditivo	Relevância
mutação/ amplificação de *EGFR*	+	+	-	Frequentemente alterado em GBM e um potencial alvo para terapia molecular e imunoterapia, um marcador diagnóstico com potencial valor prognóstico
mutação de *IDH1* ou *IDH2*	+	+	-	Geralmente identificado em astrocitomas difusos e GBM secundários, marcador diagnóstico com valor prognóstico
co-deleção de 1p/19q	+	+	+	Comumente observado em tumores oligodendrogliais, associado a melhor resposta a primeira abordagem de quimioterapia, radioterapia e melhor prognóstico
metilação do promotor de *MGMT*	+	+	+	O silenciamento do promotor do gene *MGMT* por metilação é indicativo de melhor resposta a radioterapia e/ou quimioterapia e marcador de melhor prognostico global além de ser útil no diagnostico de pseudoprogressões

Tabela 1: Marcadores com relevância para GBM. Adaptado de Tanaka *et al.*, 2013.

Mutações que levam à hiperativação do receptor ou amplificação de *EGFR* são comumente associadas ao GBM em, aproximadamente, 50% dos casos. A ativação de EGFR leva à sinalização das vias de PI3K/ Akt e Ras/ Raf/ MAPK, estando associada com aumento do crescimento tumoral, migração e angiogênese. A hiperativação de EGFR é um fator de pobre prognóstico e correlaciona com uma diminuição na sobrevida global dos pacientes (Taylor, Furnari *et al.*, 2012).

Mutações em *IDH 1* ou *2*, gene que codifica para uma enzima envolvida no ciclo de Krebs, são eventos iniciais observados no estabelecimento de astrocitomas, o que é comum em tumores de grau II e III, é utilizado na discriminação de GBMs secundários dos primários. As mutações resultam no aumento da produção de hidroxiglutarato, que é associado a um maior risco de câncer e progressão de gliomas. Apesar disso, mutações em *IDH1* são associadas a um prognóstico mais favorável em astrocitomas grau III e IV (Dang, Jin *et al.*, 2010; Thon, Kreth *et al.*, 2013) .

A co-deleção dos braços cromossômicos 1p e 19q é frequente em tumores oligodendrogliais, estando associada com maior quimiossensibilidade em astrocitomas grau III (Thon, Kreth *et al.*, 2013).

A proteína MGMT remove grupos alquil da posição O_6 de guaninas, sendo que as guaninas alquiladas levam a quebras na dupla fita do DNA e ao despareamento de bases, induzindo à apoptose e morte celular. Dessa maneira, o silenciamento de MGMT sensibiliza as células tumorais ao tratamento com agentes alquilantes como o TMZ (Thon, Kreth *et al.*, 2013).

1.3 A influência da Matriz Extracelular na progressão tumoral

A dinâmica do microambiente que circunda as células, composto pela Matriz Extracelular (MEC), células estromais e células inflamatórias infiltradas, tem um papel fundamental tanto para a homeostase dos tecidos e o desenvolvimento, como para o estabelecimento e a progressão de patologias como o câncer (Figura 1.1.) (Korpos, Wu *et al.*, 2009; Rozario e Desimone, 2010).

A MEC é composta por uma grande variedade de macromoléculas de diferentes naturezas, incluindo glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas. Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos não-ramificados de unidades de dissacarídeos compostos de uma hexosamina e um ácido urônico. Por serem moléculas polianiônicas, quando hidratadas, causam um aumento significativo do volume dos espaços intersticiais nos quais estes glicosaminogicanos estão presentes (Rozario e Desimone, 2010; Voet e Voet, 2010). Foi sugerido que uma maior hidratação do ácido hialurônico pode facilitar rotas de migração celular, facilitando a metástase (Rozario e Desimone,

2010; Toole, Ikonomidis *et al.*, 2010). Os proteoglicanos por sua vez, são compostos por agregados de glicosaminoglicanos e proteínas sendo essenciais para a matriz pericelular. A estrutura dos proteoglicanos consiste na ligação covalente de diversos glicosanimoglicanos, como o queratan-sulfato e o condroitin-sulfato, a proteínas centrais, sendo que tais estruturas, por sua vez, são associadas não-covalentemente a um filamento de ácido hialurônico. Os proteoglicanos são altamente hidratados e influenciam a difusão de moléculas sinalizadoras e a morfogênese celular (Rozario e Desimone, 2010; Voet e Voet, 2010). As glicoproteínas consistem em glicoproteínas não-colagênicas, como a fibronectina e laminina, e as glicoproteínas colagênicas. Os colágenos podem ser encontrados em formas fibrilares e não-fibrilares, sendo as proteínas mais abundantes em vertebrados. Sua estrutura em tripla-hélice é responsável por suas propriedades elásticas e sua resistência ao estresse mecânico (Rozario e Desimone, 2010). A interação entre MEC e as células residentes no tecido ocorre diretamente através de receptores de superfície para elementos da MEC, como as integrinas e os sindecanos. Devido à sua complexidade, a MEC não só atua como um suporte fisico para as células que compõe determinado tecido, mas, também, é um reservatório de fatores de crescimento, citocinas, diferentes inibidores, hormônios, entre outros. Desta forma, a MEC propicia a interação entre diferentes tipos celulares no ambito célula-célula e também promove uma interação em escala sistêmica através da difusão de moléculas sinalizadoras (Figura 1) (Korpos, Wu *et al.*, 2009; Rozario e Desimone, 2010) .

É importante ressaltar que o microambiente não só modula a expressão gênica, mas, também, influência o papel exercido por cada proteína (Bissell e Hines, 2011; Rodriguez, Lewis-Tuffin *et al.*, 2012; Trombetta-Lima, Jacomasso *et al.*, 2013). Assim

como o caso da perda de E-Caderina, uma proteína envolvida nas junções célula-célula de tecidos epiteliais é associada à transição epitélio-mesenquima e ao aumento do comportamento invasivo (Rodriguez, Lewis-Tuffin *et al.*, 2012; Trombetta-Lima, Jacomasso *et al.*, 2013). Porém, uma maior expressão de E-Caderina é associada com um comportamento mais agressivo em tumores de mama e ovário (Rodriguez, Lewis-Tuffin *et al.*, 2012; Trombetta-Lima, Jacomasso *et al.*, 2013). Foi descrito, ainda, que, sob hipóxia, sua expressão é associada ao crescimento e ao potencial invasivo destas células (Trombetta-Lima, Jacomasso *et al.*, 2013).

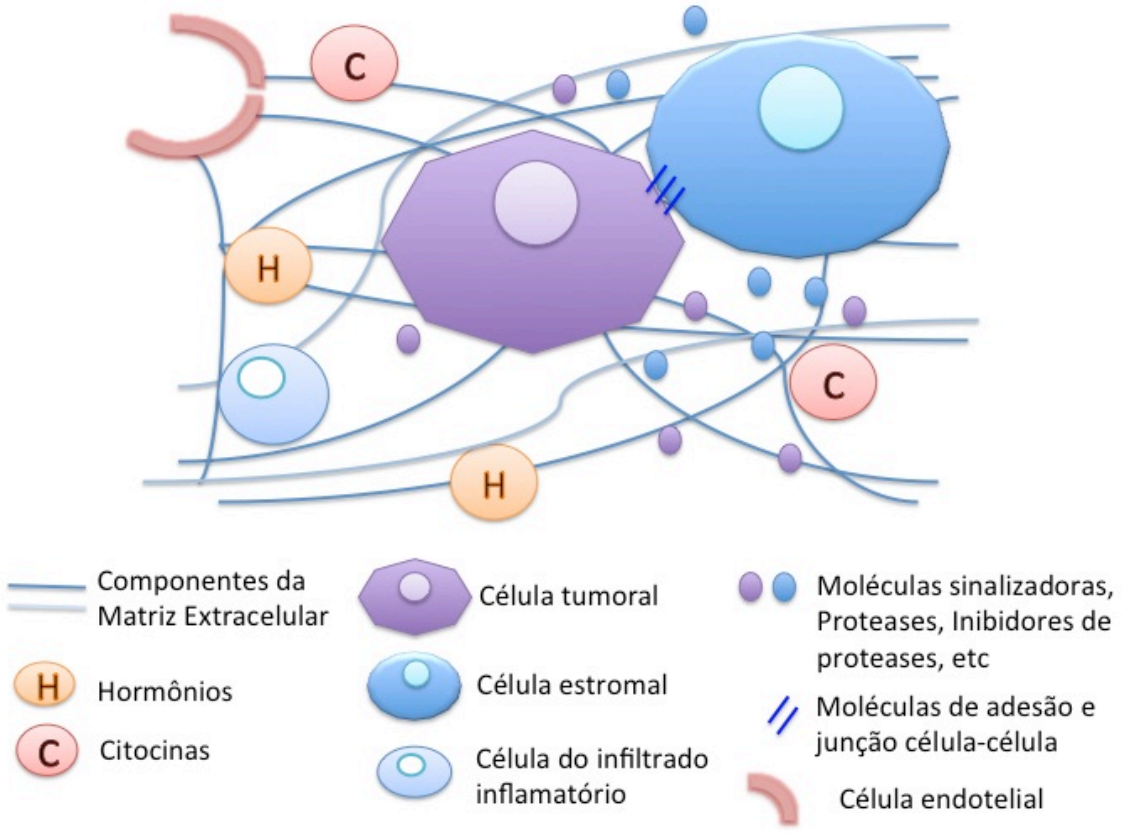


Figura 1.2: Microambiente tumoral. O microambiente que circunda a célula tumoral, composto pelos elementos da matriz extracelular, células tumorais, estromais e inflamatórias infiltradas, influência o comportamento celular e o

processo de progressão tumoral. Figura adaptada de (Trombetta-Lima, Jacomasso *et al.*, 2013).

1.4 Gliomas e a matriz extracelular

O tecido cerebral é composto de uma matriz extracelular específica e dois tipos principais de células: os neurônios e as células da glia, subdivididas em astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células ependimárias. A MEC presente no tecido cerebral adulto normal é escassa em componentes fibrilares, como colágeno, fibronectina e vitronectina, e em proteínas da membrana basal como laminina, apesar destes elementos serem abundantes no cérebro embrionário. A MEC cerebral é enriquecida em ácido hialurônico, glicoproteínas da família das lectinas (como versican e neurocan), trombospondina, tenascina C e R, entre outros, sendo uma matriz altamente hidratada (Ruoslahti, 1996; Bellail, Hunter *et al.*, 2004; Zhang, Baader *et al.*, 2004).

Observam-se mudanças na composição da MEC tumoral, relacionadas à proliferação, migração e invasão de células tumorais. Gliomas de graus mais altos apresentam maior espaço extracelular quando comparado aos gliomas de baixo grau, observando-se uma maior produção de hialuronato, presente em toda a extensão do tumor, neurocan, e tenascinas, presentes principalmente na parede dos vasos, o que se correlaciona positivamente com o grau tumoral e negativamente com a expressão de fibronectina (Asher e Bignami, 1992; Zamecnik, 2005). As células de glioma possuem uma maior expressão de integrinas e CD44, receptor de hialuronato, o que está associado a um maior potencial invasivo das células tumorais (Zamecnik, 2005).

1.5 As metaloproteinases de matriz e seus inibidores

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares que incluem as serino-proteinases, cisteíno-proteinases, ADAMs (*A Disintegrin and Metalloprotease)* e Metaloproteinases de Matriz dependentes de zinco (MMPs) (Itoh e Nagase, 2002).

As MMPs, grupo de enzimas proteolíticas dependentes de Zn^{2+}, são enzimas-chave responsáveis pelo colapso da MEC, exercendo um papel importante no desenvolvimento e na progressão de malignidades humanas (Chakraborti, Mandal *et al.*, 2003).

As MMPs podem ser secretadas ou associadas à membrana celular, podendo ser divididas em cinco grupos principais, de acordo com sua estrutura e especificidade do substrato: colagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinas (MMP-3, -10 e -11), matrilisinas (MMP-7 e -26) e associadas a membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -14 e -25). As MMPs consistem de três domínios principais: sequência sinal hidrofóbica na porção N-terminal (pré-domínio); uma região pró-domínio; e um domínio catalítico, que contém a região de afinidade ao Zn^{2+} (Shuman Moss, Jensen-Taubman *et al.*, 2012). O pró-domínio é responsável pela latência das enzimas que são secretadas como pró-enzimas, as quais devem passar por uma etapa de ativação proteolítica para exercer sua função. A maioria das MMPs apresenta um domínio Hemopexina/vitronectina conectado ao domínio catalítico através de uma alça de ligação. O domínio Hemopexina (PEX), quando presente, se liga aos inibidores de MMPs, as TIMPs (Endogenous Tissue Inhibitors of MMPs), e a determinados

substratos, além de estar envolvido no processo de ativação das MMPs (Bauvois, 2012). As MMPs de membrana possuem, em sua porção C-terminal, um domínio transmembrana de alça única e uma pequena porção citoplasmática ou um sinal de ancoramento à membrana através de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Em particular, as gelatinases A e B (MMP-2 e -9) apresentam, ainda, uma inserção de três repetições ricas em cisteína em seus domínios catalíticos (Sternlicht e Werb, 2001) (Figura 1.2).

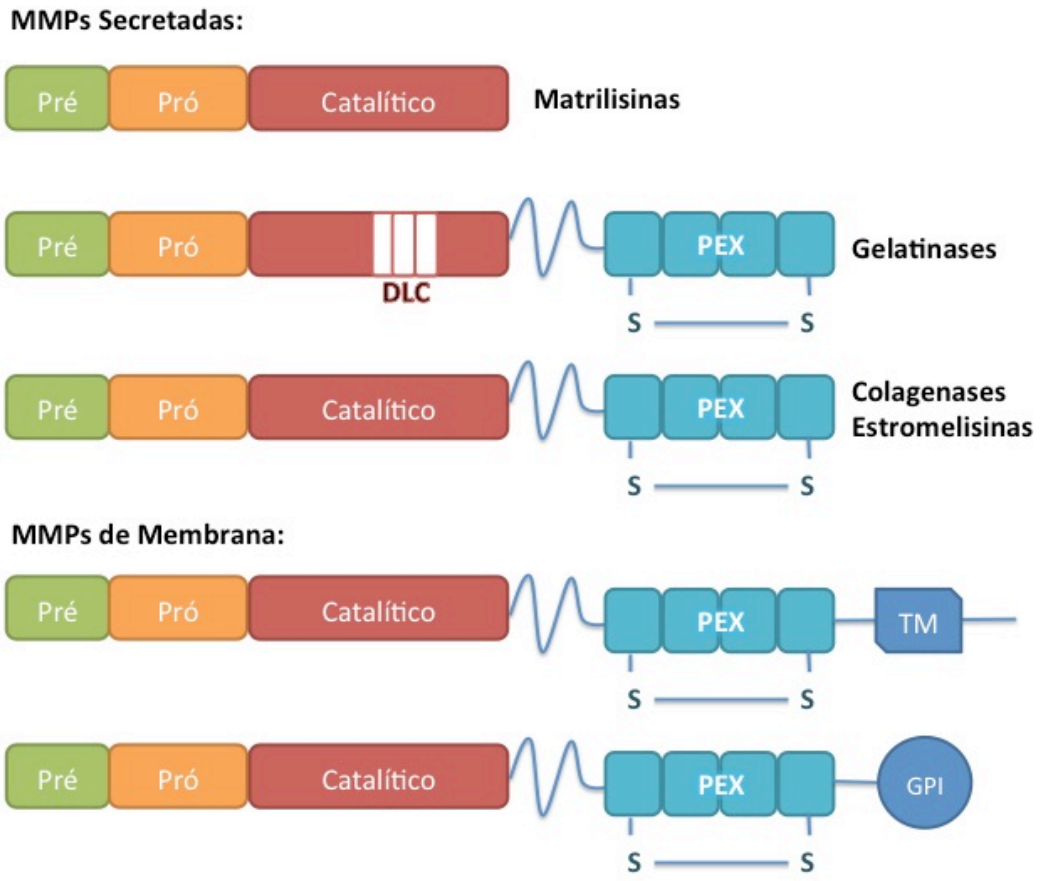


Figura 1.2.: Estruturas das MMPs. Esquema da estrutura das MMPs, evidenciando: o peptídeo sinal (Pré) que guia a MMP até o retículo endoplasmático rugoso durante sua síntese; o pró-domínio (Pró) que mantém a enzima latente; o domínio catalítico (Catalítico) que possui uma região conservada de coordenação ao Zn^{2+}; o domínio hemopexina (PEX) que é ligado ao domínio catalítico por uma alça de ligação; o domínio de ligação ao colágeno (DLC), que consiste em um domínio tipo fibronectina tipo II presente nas gelatinases; domínio transmembrana (TM); e âncora

glicosilfosfatidilinositol (GPI). Adaptado de Bauvois 2012 e Sternlicht 2001 (Sternlicht e Werb, 2001; Bauvois, 2012).

.

Por disponibilizar fatores antes envoltos pela MEC, e expor domínios de ligação a receptores celulares, além de alterar interações célula-célula e célula-matriz, a degradação da MEC através das MMPs não só facilita a invasão tumoral, mas, também, afeta o comportamento tanto das células do tumor quanto das células adjacentes, levando à progressão tumoral. No geral, os níveis de expressão relativa de MMPs aumentam conforme a progressão maligna (Itoh e Nagase, 2002).

Igualmente importantes neste processo, os inibidores de Metaloproteinases de Matriz são proteínas multifuncionais que tem papel fundamental na modulação do remodelamento da MEC, e, portanto, no comportamento das células tumorais. Dentre os inibidores de MMPs, destacam-se os Endogenous Tissue Inhibitor of MMPs (TIMPs), família composta por quatro membros que apresentam alta homologia entre si. As TIMPs são pequenas proteínas (21-34 kDa) secretadas, compostos, basicamente, por dois domínios: (i) sua porção N-terminal, que consiste de seis resíduos cisteína conservados formando três pontes dissulfeto, sendo responsável pela inibição de MMPs. Este domínio é altamente conservado entre as TIMPs, sendo composto, predominantemente, de folhas-β separadas por pequenas regiões flexíveis em alça; e sua porção C—terminal, que também apresenta seis resíduos de cisteína conservados formando três pontes dissulfeto, sendo a região menos conservada entre as TIMPs. Este domínio interage com o domínio PEX das MMPs, possibilitando a formação de complexos entre TIMPs e Pró-MMPs (Visse e Nagase, 2003; Lambert, Dasse *et al.*, 2004; Stetler-Stevenson, 2008b). A inibição das MMPs pelas TIMPs ocorre através da

coordenação do íon Zn^{2+}, associado ao sítio catalítico das MMPs pelos grupos amina e carbonil do resíduo cisteína N-terminal da TIMP de forma relativamente pouco seletiva e na proporção estequiométrica de 1:1 (Visse e Nagase, 2003; Lambert, Dasse *et al.*, 2004; Stetler-Stevenson, 2008b; Tallant, Marrero *et al.*, 2010).

Quanto à sua localização, as TIMP-1, -2 e -4 são encontrados na forma solúvel, difundidos no espaço extracelular, e o TIMP-3 encontra-se associado a glicosaminoglicanos sulfatados presentes na região pericelular e na membrana basal (Singh, Ohguro *et al.*, 2000b; Stetler-Stevenson, 2008a). É interessante notar que quanto à especificidade do substrato, TIMP-1 inibe fracamente MMPs de membrana, enquanto TIMP-2 inibe diretamente MT1-MMP (MMP-14), e sua interação com esta MMP promove a ativação de Pró-MMP-2 na superfície celular (Singh, Ohguro *et al.*, 2000b; Stetler-Stevenson, 2008a). TIMP-3, por sua vez, inibe também membros da família dos ADAMs, de forma aparentemente independente de sua inibição de MMPs (Amour, Knight *et al.*, 2000; Jin, Kashiwagi *et al.*, 2001; Loechel e Wewer, 2001).

Além de seu papel como inibidor de Metaloproteinases (MMPs), a associação de TIMP-1 a CD63 está ligada à inibição do crescimento celular e promoção da apoptose (Stetler-Stevenson, 2008a). Por outro lado, TIMP-1 e -2 também são descritos como promotores da divisão celular em diferentes tipos celulares como queratinócitos, células mesenquimais e linhagens tumorais (Stetler-Stevenson, 2008b; a; Trombetta-Lima, Jacomasso *et al.*, 2013). TIMP-1 é considerado um marcador de malignidade para diversos tipos tumorais, como tumores de fígado, mama, próstata e glioblastoma (Crocker, Ashley *et al.*, 2011; Bunatova, Pesta *et al.*, 2012; Neri, Megha *et al.*, 2012). Atualmente, existem patentes para o uso de TIMP-1 como marcador de malignidade em câncer (EP 1619206 A3), câncer coloretal (EP 2145190 A1), e o uso da correlação de

alterações em seu padrão de glicosilação com tumorigênese e metástase (EP 1972939 B1).

1.6 O gene supressor de tumor *RECK*

O gene *RECK (REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs)* foi inicialmente isolado e caracterizado como um gene supressor de tumor através de uma abordagem de varredura de uma biblioteca de cDNA de fibroblasto normal, por induzir, quando superexpresso, a reversão fenotípica da linhagem DT, uma sub-linhagem de células NIH–3T3 transformadas com o oncogene *ν-K–ras* (Takahashi, Sheng *et al.*, 1998).

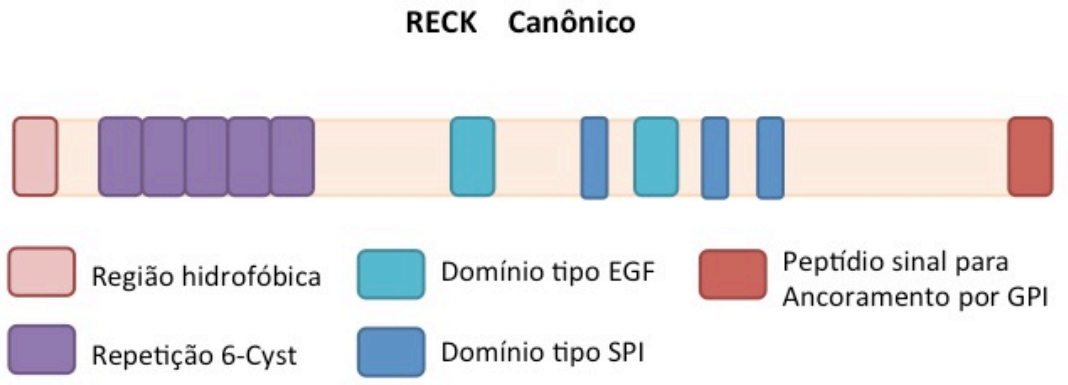


Figura 1.5.1.: Estrutura da proteína RECK canônica. Esquema da estrutura de RECK canônico, evidenciando: a porção N-terminal hidrofóbica, as repetições 6-Cyst, os domínios do tipo Fator de Crescimento Epidermal (EGF), os domínios tipo Inibidor de Serina Protease (SPI), e o peptídeo sinal para ancoramento por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Figura adaptada de Takahashi *et al*., 1998 (Takahashi C, 1998).

O gene RECK humano está localizado no cromossomo 9p13, recobrindo mais de 87 kb do genoma humano (Eisenberg, Hochner *et al.*, 2002). Atualmente, uma única variante de *RECK* é descrita na literatura, a qual será aqui denominada *RECK* canônica, que consiste de 21 exons e 20 introns (Eisenberg, Hochner *et al.*, 2002). O transcrito canônico de *RECK* codifica uma glicoproteína de membrana de 971 aminoácidos (aa) e 110 kDa, sendo rica em cisteína (9%). RECK possui uma região hidrofóbica em sua porção N-terminal composta por 26 aa, que atua como um peptídeo sinal. A porção C-terminal também possui uma região hidrofóbica de 29 aa, que atua como sinal de ancoramento por GPI (Takahashi, Sheng *et al.*, 1998; Baker, Edwards *et al.*, 2002). RECK possui, ainda, três domínios do tipo Inibidor de Serina Protease (SPI), o primeiro (resíduos 635-654) com total homologia ao motivo Kazal, e os dois seguintes (resíduos 716-735 e 754-772) apresentando motivos Kazal incompletos. RECK também apresenta duas regiões (resíduos 493-523 e 676-709) de fraca homologia ao domínio tipo Fator de Crescimento Epidermal (EGF), cinco sítios de glicosilação, e, em sua porção N-terminal, cinco domínios putativos de nó de cisteína (repetição 6-Cyst, resíduos 37-84) (Takahashi C, 1998) (Figura 1.3.1.).

A proteína RECK canônica é amplamente expressa em diversos tecidos humanos normais, porém, sua expressão não é detectável em diversas linhagens celulares derivadas de tumores e células transformadas por diversos oncogenes. A superexpressão de RECK canônico em linhagens celulares derivadas de tumor leva à supressão da atividade invasiva e metastática destas células (Takahashi, Sheng *et al.*, 1998). Como já mencionado, evidências clínicas mostraram um valor prognóstico para RECK durante a progressão de vários tipos tumorais como hepatocarcinoma

(Furumoto, Arii *et al.*, 2001), carcinoma pancreático (Masui, Doi *et al.*, 2003), carcinoma mamário humano (Span Pn, 2003), e carcinoma de células não pequenas de pulmão (Takenaka, Ishikawa *et al.*, 2004; Takenaka, Ishikawa *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que RECK regula negativamente a atividade de, pelo menos, quatro membros da família de Metaloproteinases de Matriz, a saber: MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP) (Oh, Takahashi *et al.*, 2001). O modelo proposto para a atuação de RECK postula que, devido à sua localização na superfície celular, RECK inibe a atividade de MMP-7 e, diretamente, a atividade de MMP-14. Por inibir MMP-14, RECK inibe, também, a cascata de ativação de pró-MMP-2, que envolve a formação de um complexo ternário entre MMP-14, TIMP-2 e pró-MMP-2. Além disso, RECK inibe a ativação auto-proteolítica de MMP-2 e a secreção de pró-MMP-9, além de inibir transcricionalmente *MMP-9* (Takahashi, Sheng *et al.*, 1998; Sasahara Rm, 2002; Noda e Takahashi, 2007) (Figura 1.3.2.). Outros alvos de RECK foram identificados, como a metaloproteinase ADAM10, e a ectopeptidase de membrana CD13/ Aminopeptidase N (Kitange, Mladek *et al.*; Lalezari, Chou *et al.*) e, recentemente, foi descrito o envolvimento de RECK na estabilização de adesões focais e da polaridade celular anterior-posterior (Morioka, Monypenny *et al.*, 2009).

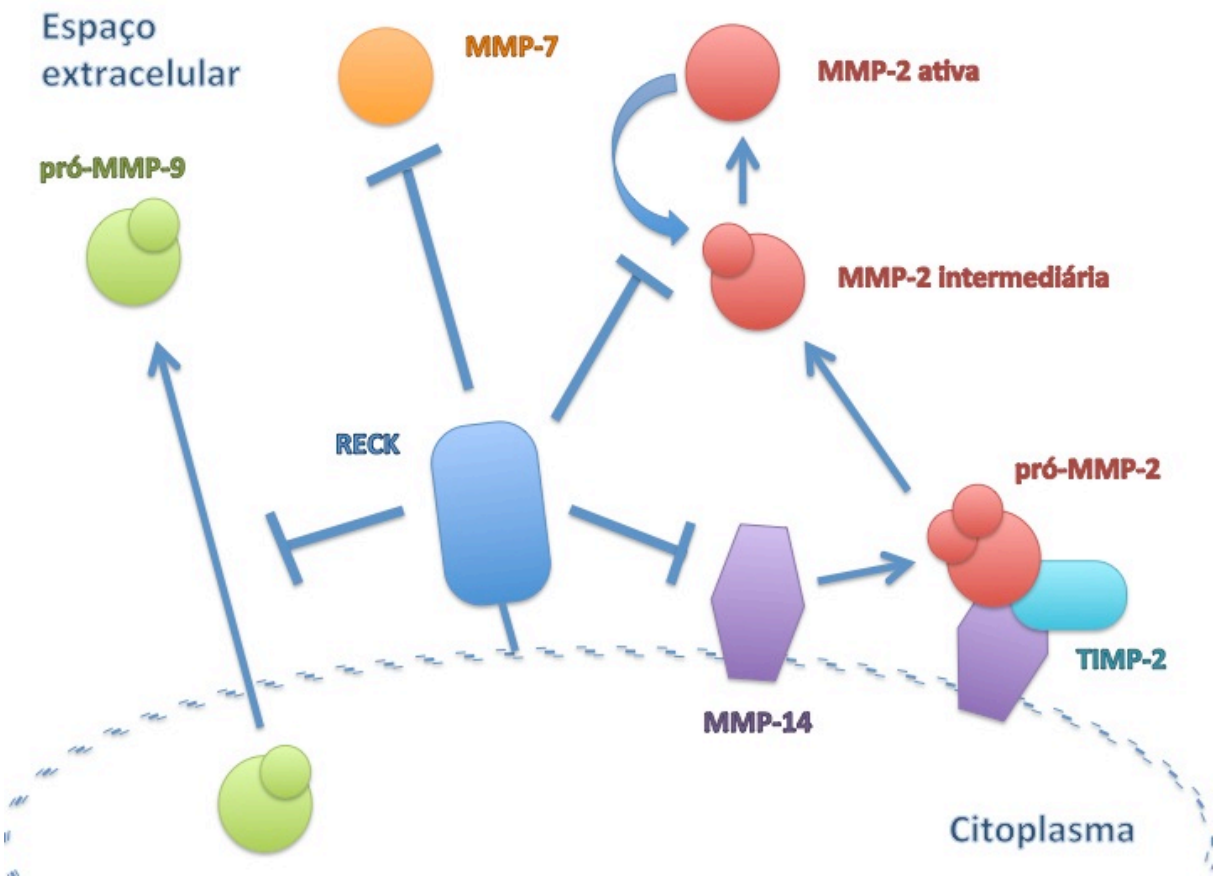


Figura 1.5.2.: Regulação da atividade de MMPs por RECK. Mecanismo de inibição de MMPs por RECK. RECK inibe a atividade de MMP-7 e MMP-14, a ativação de pró-MMP-2 e a secreção de MMP-9. Adaptado de (Noda e Takahashi, 2007).

As funções biológicas de *RECK in vivo* foram exploradas através de experimentos com camundongos nocaute e de ensaios de tumorigenicidade em camundongos *nude* (Oh, Takahashi *et al.*, 2001). Camundongos nos quais a proteína RECK funcional está ausente morrem em torno do décimo dia da fase embrionária com deficiências de fibras de colágeno, desorganização da lâmina basal e comprometimento do desenvolvimento vascular (Oh, Takahashi *et al.*, 2001). Ensaios de tumorigenicidade em camundongos

nude sugerem que RECK inibe a angiogênese tumoral, uma vez que as ramificações vasculares foram dramaticamente suprimidas nos tumores gerados a partir de células de fibrossarcoma que superexpressavam RECK. É interessante notar que os camundongos que desenvolveram tumores a partir de células de fibrossarcoma expressando o gene RECK constitutivamente, apresentaram maior sobrevida quando comparados àqueles que desenvolveram o tumor controle (Oh, Takahashi *et al.*, 2001). Em modelo endotelial, TIMP-2, também descrito como inibidor de angiogênese, induz a expressão de RECK (Oh, Takahashi *et al.*, 2001; Stetler-Stevenson, 2008a). Estudos recentes demonstraram que o gene *RECK* tem, também, um papel importante no controle da proliferação celular(Winnischofer, 2005).

Dessa forma, os dados obtidos até o momento sugerem que RECK canônico inibe a atividade de MMPs, inibindo, assim, a invasão tumoral, metástase e angiogênese tumoral, sendo sua expressão clinicamente correlacionada com maior tempo de sobrevida global e livre de recorrência (Takahashi, Sheng *et al.*, 1998; Oh, Takahashi *et al.*, 2001; Sasahara Rm, 2002; Takenaka, Ishikawa *et al.*, 2004; Takenaka, Ishikawa *et al.*, 2005), podendo, portanto, ser alvo promissor para a prevenção e o tratamento de câncer.

1.7 O remodelamento da MEC em astrocitomas

Devido à característica altamente invasiva de gliomas em relação ao tecido normal adjacente, as MMPs têm papel crucial para sua progressão. Em particular, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 são peças-chave na invasão de gliomas. Uma forte correlação entre a alta expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-14 de membrana e a

progressão de astrocitomas foi descrita (Itoh Y, 2002; Schwartzbaum, Fisher *et al.*, 2006; Ohgaki e Kleihues, 2007; Hagemann, Anacker *et al.*, 2012).

A expressão de MMP-2 está correlacionada com a progressão tumoral de gliomas, sendo também intensa em células da glia nas vizinhanças do tumor. Quanto à sua distribuição no tumor, observa-se uma maior expressão em regiões com alta densidade celular e em células endoteliais com um padrão de difusão radial ao redor da perivasculatura. MMP-2 possui um papel importante na neoangiogênese tumoral e na maturação dos vasos (Nagashima, Suzuki *et al.*, 2002; Du, Petritsch *et al.*, 2008; Hagemann, Anacker *et al.*, 2012).

MMP-9, por outro lado, não apresenta expressão significativa em tecido cerebral normal sendo que sua expressão relativa e atividade aumentam conforme aumenta a agressividade do tumor (Hagemann, Anacker et al., 2012). MMP-9 é expresso tanto por células tumorais quanto por células endoteliais do tumor, com uma intensa marcação sendo encontrada por imunohistoquímica na vizinhança de regiões de necrose (Nagashima, Suzuki *et al.*, 2002; Du, Petritsch *et al.*, 2008; Hagemann, Anacker *et al.*, 2012).

Como a via de sinalização celular desencadeada pelo fator de crescimento EGF induz a expressão de MMP-9, é interessante observar que a expressão de MMP-9 é maior em GBMs primários quando comparados a GBMs secundários, sendo que GBMs primários frequentemente apresentam superexpressão de EGFR, não observada em GBMs secundários, que geralmente apresentam mutações em p53. (Rao, Yamamoto *et al.*, 1996; Nagashima, Suzuki *et al.*, 2002; Rao, Lees *et al.*, 2003; Hagemann, Anacker *et al.*, 2012).

A expressão de MMP-14 é escassa em tecido normal e em astrocitomas de baixo grau de malignidade, porém é intensa em astrócitos transformados em amostras de GBM, células endoteliais e na região perivascular do tumor (Levicar, Nuttall *et al.*, 2003; Hagemann, Anacker *et al.*, 2012)

É interessante notar que MMP-2, -9 e -14 estão associadas a estruturas especializadas, denominadas invadopódias, em diversos tipos tumorais. As invadopódias consistem de agregados ricos em actina que formam protuberâncias em direção à MEC, sendo que estas estruturas concentram proteases que auxiliam na degradação da MEC e são cruciais para a invasão tumoral (Linder, 2007).

Como já mencionado, TIMP-1, apesar de ser um inibidor de MMPs, está relacionado, também, ao aumento da proliferação celular em diversos tipos de tumor revisado em (Trombetta-Lima, Jacomasso et al., 2013), sendo, de fato, um marcador de malignidade e de um pobre prognóstico em GBM (Polisetty, Gupta et al., 2011). A expressão de TIMP-1 é encontrada tanto em astrócitos transformados quanto na vasculatura tumoral (Groft, Muzik *et al.*, 2001). Além disso, TIMP-1 também pode ser detectado no plasma de pacientes, assim como MMP-9 (Lin, Wang et al., 2013).

Aparentemente, TIMP-2 e TIMP-3 não apresentam uma modulação clara durante a progressão de astrocitomas (Nakada, Kita et al., 2001) (Groft, Muzik et al., 2001). Porém, foi descrito que uma menor expressão de TIMP-2 correlaciona com um pobre prognóstico em pacientes com GBM (Nakada, Kita et al., 2001). Neste sentido, a indução da expressão de TIMP-2, em células U87 MG de glioma humano, leva à diminuição do potencial invasivo da linhagem (Hoshi, Harada et al., 2000). Porém, o balanço de expressão entre TIMP-2 e MMP-2 deve ser levado em consideração, já que TIMP-2 também está envolvido na cascata de ativação de MMP-2 e, dependendo deste

balanço, quando superexpresso, pode aumentar o potencial invasivo de células U87 MG (Gorbunova, Seluanov et al., 2004). Foi descrita a metilacão do promotor de TIMP-3 na progressão de astrocitomas grau II para GBMs secundários, o que correlaciona com um prognóstico pobre para pacientes com astrocitoma grau II (Nakamura, Ishida et al., 2005).

TIMP-4, por sua vez, apresenta uma menor expressão conforme o aumento da malignidade de astrocitomas (Groft, Muzik et al., 2001). Quanto à sua distribuição, TIMP-4 é predominantemente expresso pelos astrócitos transformados (Groft, Muzik et al., 2001). Sua superexpressão em células U87 MG e U251 de glioma humano leva à diminuição da capacidade invasiva destas linhagens in vitro (Groft, Muzik et al., 2001). Porém, foi descrito que a co-expressão de TIMP-4 e CD63 está relacionada com uma maior agressividade e pior prognóstico em pacientes com GBM (Rorive, Lopez et al., 2010).

Foi descrito que a superexpressão de *RECK* canônico diminui o potencial invasivo e migratório de células T98G de glioma humano, através do rearranjo de fibras de actina (Correa, Brohem *et al.*, 2006; Silveira Correa, Massaro *et al.*, 2010). Foi descrito que o microRNA miR21 aumenta a invasividade de gliomas através de seu efeito supressor sobre a expressão de *RECK* (Han, Yue *et al.*, 2012). Por outro lado, a expressão de RECK foi descrita em células endoteliais de astrocitomas, correlacionando, positivamente, com o grau de malignidade das amostras (Rahmah, Sakai *et al.*, 2012). É importante ressaltar que o mecanismo molecular de ação de *RECK* ainda não é completamente claro.

1.8 Processamento de RNA e *Splicing* alternativo

Diversos genes eucarióticos possuem sua região codificante fragmentada, sendo chamados de genes descontínuos ou fragmentados. Sendo as sequências retidas no RNA mensageiro madura denominadas exons e as excluidas, introns. O pré-RNA mensageiro (pré-mRNA) transcrito a partir destes genes deve passar por um processamento para exclusão das regiões não codificantes, de forma a atingir sua sequência madura, e ser exportado para o citoplasma para ser traduzido. Este processamento, chamado de *splicing*, foi primeiramente descrito em 1977 para o mRNA do gene *Hexon polipeptide*, que codifica uma proteína estrutural de adenovírus 2 (Berget e Sharp, 1977), abrindo novas perspectivas para o estudo da regulação da expressão gênica. Observou-se, ainda, que os limites exon-intron (sítio doador ou sítio de processamento 5', limite 5' do intron analisado) e intron-exon (sítio aceptor ou sítio de processamento 3', limite 3' do intron analisado) apresentam, em muitos casos, sequências consenso, além da presença de um sÍtio de ramificação (que consiste em uma adenina na porção interna do intron) seguida, à jusante, de uma porção rica em pirimidinas chamada de trato de poli-pirimidinas (Y), demonstrando a influência de elementos *cis* na sequência do pré-mRNA para o reconhecimento dos introns e seu processamento (Mount Sm, 1982).

Desde então, muito já foi desvendado sobre o mecanismo de *splicing* e o reconhecimento das fronteiras exon-intron, sendo, a maioria dos mRNAs de genes eucarióticos, processados por um complexo dinâmico de ribonucleoproteínas denominado *spliceossomo*, numa reação que envolve duas transesterificações.

Resumidamente, em uma primeira etapa, o sítio de processamento 5' é reconhecido pelo snRNA (*small nuclear RNA*) da ribonucleoproteína snRNP U1 (*small nuclear ribonuclearprotein*), o que induz a associação de uma subunidade da proteína U2AF (*U2 Auxiliary Factor*) ao trato de pirimidinas e outra ao sítio de processamento 3'. A subunidade associada à Poli (Y) interage com a proteína BBP (*Branch-point Binding Protein*), facilitando sua associação ao sítio de ramificação. O complexo formado nesta primeira etapa é chamado de complexo E (*Early complex*). Numa segunda etapa, U2AF recruta a snRNP U2 a qual se associa ao sítio de ramificação deslocando a BBP, formando o complexo A. O pareamento entre a região do sítio de ramificação e os snRNAs presentes no snRNP U2, leva à exposição de uma adenina do sítio de ramificação. Ocorre, então, o recrutamento das snRNPs U4, U5 e U6 (as quais, conjuntamente, formam a partícula tri-snRNP), dando origem ao complexo B. A mudança de conformação induz a saída do snRNP U1, e snRNP U6 passa a se associar ao sítio de *splicing* 5' (complexo B ativado, complexo B^{At}). Em seguida, snRNP U4 é liberada do complexo, permitindo o pareamento entre os snRNA de snRNP U2 e U6, e essa interação leva à aproximação da adenina exposta ao sítio de processamento 5'. Assim, o grupo 2'-OH da adenina realiza um ataque nucleofílico ao fosfato da guanina do sítio de processamento 5', rompendo a ligação fosfodiester na fronteira exon-intron e ligando a extremidade 5' do intron à adenina do sítio de ramificação numa reação de transesterificação. A snRNP U5 induz a aproximação da extremidade 3' livre recém formada do exon com o sítio de processamento 3' (complexo C). Ocorre então uma segunda reação de transesterificação entre o 3'-OH do nucleotídeo livre da extremidade do exon processado e o grupo fosfato na fronteira intron-exon, conectando

as extremidades dos dois exons e liberando o intron juntamente com o complexo do *spliceossomo* (Figura 1.4.1) (Watson, Baker *et al.*, 2006; Lewin, 2010).

Com o sequenciamento do genoma de diversos organismos, tornou-se claro que a complexidade genômica de uma espécie não é diretamente refletida pelo número de genes que possui. Apesar da existência de sequências consenso, que apresentam grande degeneração, a identificação das fronteiras exon-intron-exon de um mesmo pré-mRNA nem sempre é trivial. A força dos sítios doador e aceptor de *splicing*, a qual depende da sua homologia às sequências consensos, tem grande influência na determinação desses sítios, por sua afinidade às snRNPs. Porém, são comuns os casos de reconhecimento de sítios que divergem das sequências ótimas pelo *spliceossomo*. Esse comportamento é influenciado por diversos fatores como: a interação de sequências silenciadoras ou acentuadoras, que podem estar localizadas na região exônica ou intrônica, processo transcricional, posicionamento do nucleossomo e modificações na configuração da cromatina, entre outros, que dependendo do contexto, atuam de forma antagônica ou sinergética (De Conti, Baralle *et al.*, 2013).

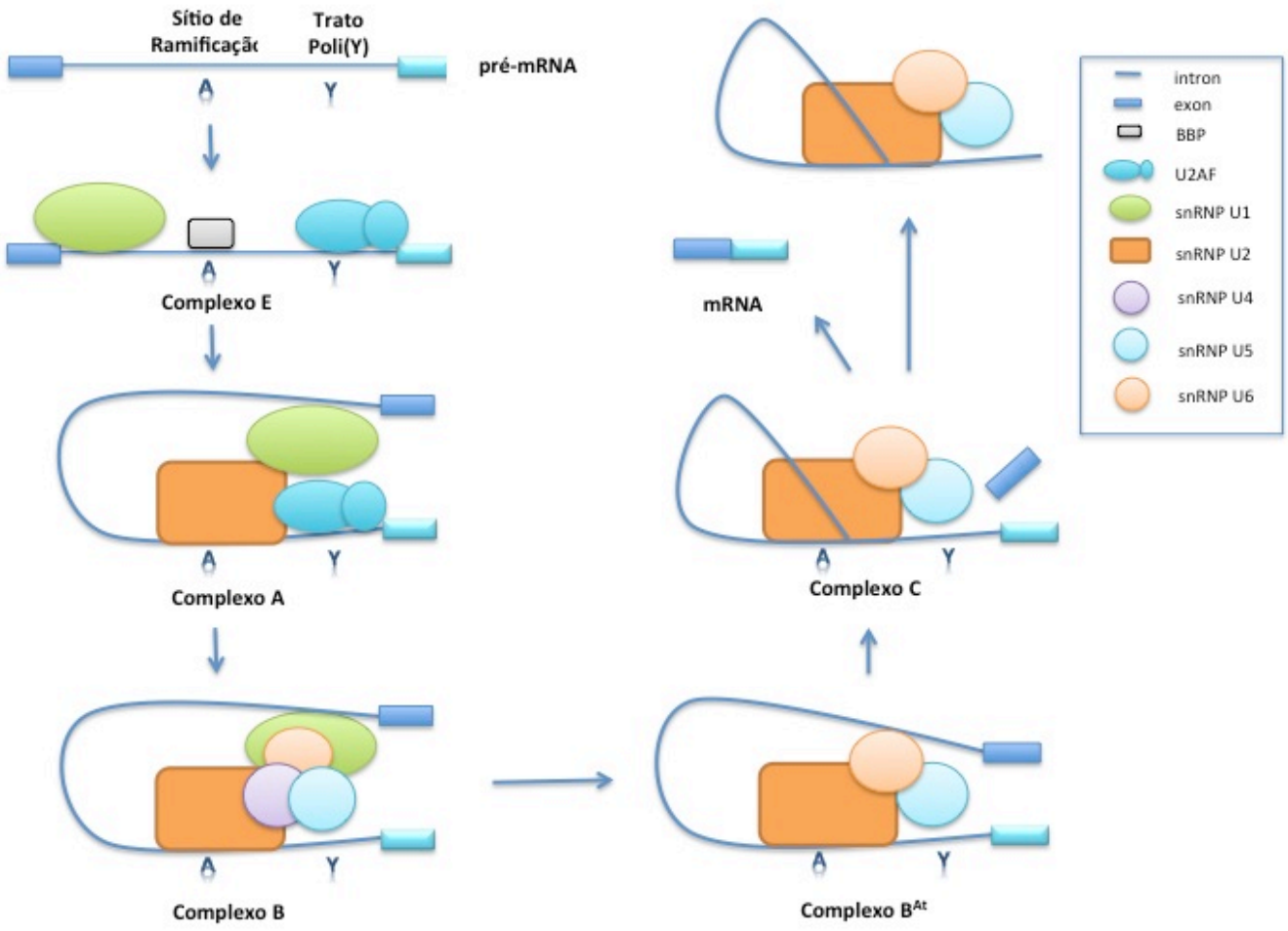


Figura 1.7.1.: Processamento do pré-mRNA. Representação esquemática do processamento de mRNA pelo complexo do spliceossomo conforme descrito no texto, sendo que a localização do sítio de ramificação está evidenciada por A e a localização do trato de pirimidina está evidenciada por Y. Figura adaptada de (Bonnal, Vigevani *et al.*, 2012)

Fatores regulatórios *cis* têm um papel essencial para a inclusão ou exclusão de exons. Sequências acentuadoras, denominadas ESE (*Exonic Splicing Enhancer*) ou ISE (*Intronic Splicing Enhancer*) dependendo de sua localização, geralmente recrutam proteínas intermediárias (elementos *trans*), como, por exemplo, as proteínas da família

SR (*Serine/ Arginine Rich*), as quais, por sua vez, recrutam membros do complexo E do spliceossomo para as fronteiras exon-intron/ intron-exon (De Conti, Baralle *et al.*, 2013). Por outro lado, sequências silenciadoras, denominadas ESS (*Exonic Splicing Silencer)* ou ISS (*Intronic Splicing Silencer*), dependendo de sua localização, atuam recrutando proteínas como os membros da família hnRNP, que atuam impedindo a formação do complexo E por impedimento estérico ou promovendo a formação de estruturas secundárias inibitórias no RNA. Alterações na estrutura secundária do transcrito primário são responsáveis por tornar disponível, ou indisponível, sitios doadores/ aceptores, assim como elementos *cis* acentuadores ou silenciadores (De Conti, Baralle *et al.*, 2013) . Foi demonstrado que os eventos de *splicing* alternativo são influenciados pela transcrição, variando de acordo com a região promotora do gene em questão, assim como os fatores de transcrição recrutados para tal região (Kornblihtt, 2005; De Conti, Baralle *et al.*, 2013) . Além disso, a conformação da cromatina na região transcrita tem sua influência em eventos de *splicing*, observando-se uma maior densidade de nucleossomos em regiões correspondentes a exons quando comparadas a introns, e, ainda maior em regiões sujeitas a *splicing* alternativo. Acredita-se que os nucleossomos diminuam a velocidade de transcrição na região, permitindo o reconhecimento de fronteiras exon/intron, intron/exon de forma acoplada à transcrição (Kornblihtt, 2005; Tilgner, Nikolaou *et al.*, 2009; De Conti, Baralle *et al.*, 2013).

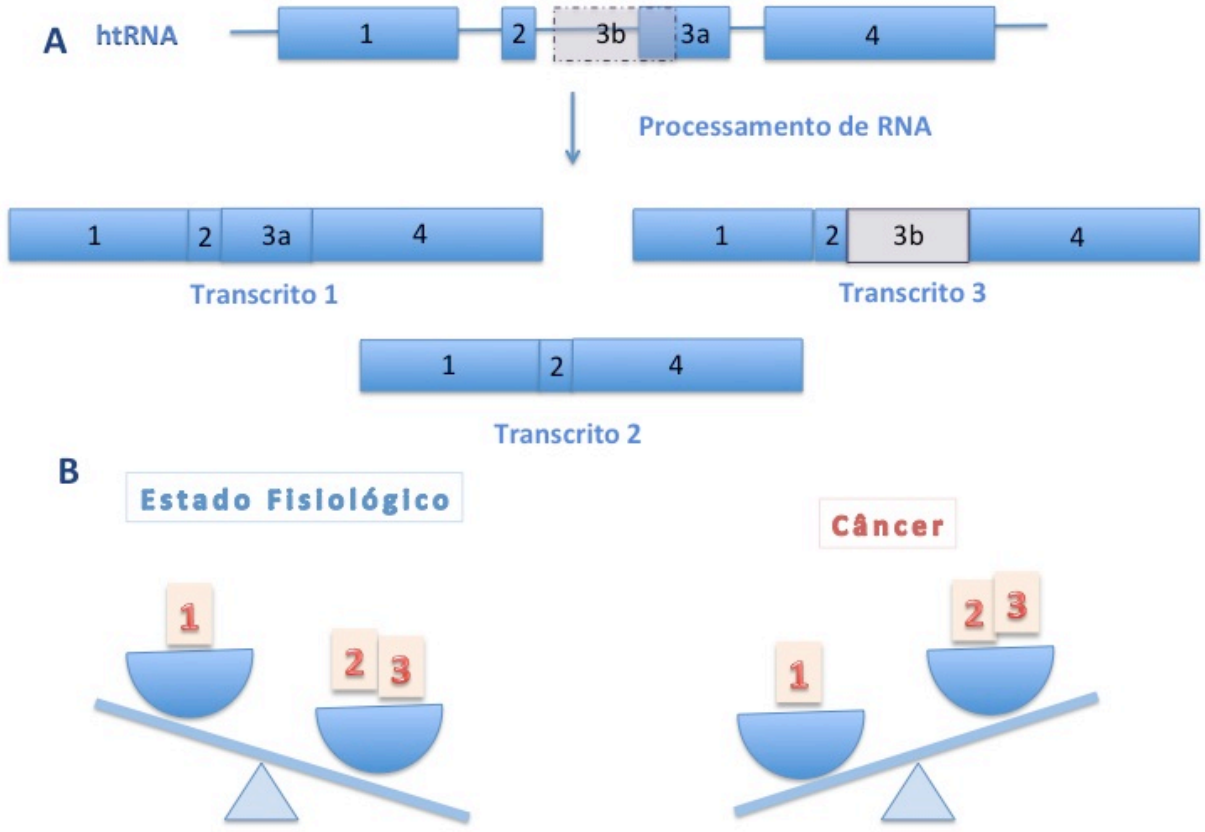


Figura 1.7.2.: *Splicing* alternativo. O processamento do pré-mRNA (htRNA - heterogenous immature RNA) por *splicing* pode levar à formação de mRNAs maduros alternativos através da exclusão ou inclusão de exons e seleção de fronteiras exon-intron alternativas (A). O balanço entre as variantes de *splicing* pode influenciar o funcionamento de determinada via de sinalização, podendo resultar no desenvolvimento de condições patológicas como o câncer (B). Figura adaptada de Trombetta-Lima *et al.*, 2013.

No genoma humano e em todos os eucariotos superiores, o *splicing* alternativo (SA) de pré-RNAs mensageiros permite uma enorme complexidade e flexibilidade em relação à expressão gênica, sendo a maior fonte de diversidade protéica em células eucarióticas (Figura 1.4.2. - A). É estimado que mais de 90% dos genes humanos multiexons gerem, pelo menos, dois transcritos diferentes (Pan, Shai *et al.*, 2008). A seleção alternativa das fronteiras exon-intron durante a maturação do mRNA pode levar

a produtos protéicos com funções diferentes ou até antagônicas. Eventos de *splicing* associados com câncer ou outras patologias têm sido descritos e amplamente revisados (Figura 1.4.2 – B) (Germann, Gratadou *et al.*, 2012).

O *splicing* alternativo pode ter papel crucial na biologia do câncer, determinando se um dado gene irá gerar uma oncoproteína ou uma proteína supressora de tumor. O conjunto de exons presentes em um mRNA maduro é afetado por vias de sinalização oncogências, tais como Ras/PI3K/Akt (Blaustein, Pelisch *et al.*, 2005) Ras/Raf/MEK/ERK (Weg-Remers, Ponta *et al.*, 2001), e c-Myc(Das, Anczukow *et al.*, 2012), que levam à alterações na expressão de reguladores de *splicing*, como os membros da família de proteínas das Serine-Arginine (SR), que promovem mudanças no padrão de *splicing* de genes envolvidos nas vias de apoptose, progressão do ciclo celular, motilidade celular, transição epitélio-mesenquima, entre outros (Germann, Gratadou *et al.*, 2012; Trombetta-Lima, Jacomasso *et al.*, 2013). Esses fatores se associam a elementos ESE (*Exonic Splicing Enhancer*) do pré-mRNA de modo a favorecer a inclusão ou exclusão de determinado exon durante o *splicing*. Uma proteína membro desta família, a SRSF1 (Serine/arginine-rich Splicing Factor 1) tem sido associada à eventos de *splicing* pró-tumorais, sendo, aparentemente, o ponto de convergência de diferentes cascatas oncogênicas (Germann, Gratadou *et al.*, 2012). Foi descrito que a superexpressão de SRSF1 leva à transformação de células normais, enquanto sua supressão leva à reversão parcial do fenótipo malígno de linhagens tumorais (Anczukow, Rosenberg *et al.*, 2012). Porém, a indução de *splicing* por SRSF1 demonstra grande variedade, levando à produção de variantes pró- e anti-tumorais, influenciando o padrão de *splicing* de genes como *Ciclina D1*, envolvido na progressão

do ciclo celular, *Bcl-X* e *Mcl1*, envolvidos na cascata de apoptose, e *Rac1* e *Ron*, relacionados com a motilidade celular (Germann, Gratadou *et al.*, 2012).

Isoformas de genes supressores de tumor, geradas por *splicing* alternativo, podem perder sua atividade supressora, ou mesmo gerar isoformas antagônicas, pró-tumorais. Pode-se citar, como exemplo, o Lens Epithelium-Derived Growth Factor 75 (LEDGF/p75), que é um fator de transcrição associado a um maior potencial metastático, resistência a estresse oxidativo e quimioresistência (Singh, Ohguro *et al.*, 2000a). A proteína p75 ativa a resposta ao estresse e genes anti-oxidantes para promover a sobrevivência celular. Sua isoforma, gerada por *splicing* alternativo, LEDGF/p52, compartilha sua porção N-terminal com a isoforma p75, porém apresenta um C-terminal diferente. Diante de sua ativação, através da clivagem de um domínio presente em seu N-terminal por caspase-3, p52 inibe a ativação de proteínas anti-oxidantes e relacionadas ao estresse, induzindo a apoptose de células tumorais (Brown-Bryan, Leoh *et al.*, 2008). Um exemplo clássico da dinâmica entre variantes de *splicing* de um mesmo gene na regulação de processos celulares específicos, é o caso do gene *Bcl-X.* Este gene codifica uma isoforma pequena, pró-apoptótica, Bcl-X_s, e uma isoforma longa, anti-apoptótica, Bcl-X_L. Ambas as isoformas estão envolvidas na via de apoptose intrínseca, regulando, de forma antagônica, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, um passo necessário para a liberação de citocromo C para o citosol e a formação do apoptossomo (Boise, Gonzalez-Garcia *et al.*, 1993).

Além disso, mutações em elementos reguladores de *splicing*, contidos na sequência nucleotídica, e alterações na maquinaria celular regulatória de *splicing* resultam em mudanças no padrão de *splicing* de diversos genes relacionados com o

câncer, como *CD44*, *BRCA1*, *APC*, *p53* e *FHIT*, entre outros (Pajares, Ezponda *et al.*, 2007; Scholzova, Malik *et al.*, 2007; Skotheim e Nees, 2007). Neste contexto, a análise de *splicing* alternativo de genes envolvidos com a progressão tumoral e suas consequências moleculares é promissora, e componentes do *spliceossomo* estão sendo estudados, atualmente, como alvos terapêuticos para drogas antitumorais (Bonnal, Vigevani *et al.*, 2012).

Neste trabalho, propõe-se a identificação de variantes geradas por *splicing* alternativo do gene supressor de tumor *RECK* e sua caracterização funcional, cujo envolvimento na via de atuação da forma canônica pode ajudar a esclarecer seu mecanismo de ação e contribuir para uma aplicação mais precisa do potencial valor prognóstico deste gene.

2.Objetivos

2.1. Objetivo geral

O mecanismo de ação do gene *RECK* ainda não é totalmente claro e, até o momento, somente uma variante de *RECK* é descrita na literatura. Tendo em vista o impacto de isoformas geradas por *splicing* alternativo em diversas vias essenciais para progressos fisiológicos e patológicos, como o câncer, este trabalho tem como objetivo a identificação e uma primeira caracterização de variantes de *splicing* alternativo do gene supressor de tumor *RECK,* incluindo a análise da contribuição destas variantes para modelos nos quais o papel de *RECK* canônico é relevante, com foco no modelo de astrocitomas.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Identificação e caracterização das variantes de *splicing* alternativo do gene supressor de tumor *RECK*

a. Análise de *Expressed Sequence Tags* e sequências de RNA não referência para indentificação de variantes de *Splicing* de *RECK.*

b. Amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento das variantes de *Splicing* de *RECK.*

c. Análise da sequência nucleotídica das variantes de *splicing* de *RECK*.

d. Análise da sequência predita das isoformas de RECK e sua expressão.

e. Perfil de expressão dos transcritos de *RECK* em painel de RNA de tecidos normais.

2.2.2. As variantes de *splicing* de *RECK* e seu envolvimento na biologia de astrocitomas.

a. Perfil de expressão dos transcritos de *RECK, MMPs e TIMPs* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.

b. Correlação entre os níveis de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em astrocitomas.

c. Correlação entre a expressão e balanço das expressões dos transcritos de *RECK* e sobrevida global de pacientes com GBM.

d. Análise funcional das isoformas de RECK em linhagem de Glioblastoma Multiforme humano.

i. Estabelecimento de linhagens derivadas de U87 MG superexpressando cada uma das isoformas de RECK.

ii. Análise da taxa de proliferação celular de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK.

iii. Análise da capacidade migratória de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK.

iv. Análise da capacidade invasiva de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK.

v. Análise da expressão de *MMPs e TIMPs* nas linhagens superexpressando as isoformas de RECK.

vi. Análise da atividade de MMP-2 e -9 nas linhagens superexpressando as isoformas de RECK.

vii. Análise da capacidade tumorigênica das linhagens superexpressando as isoformas de RECK.

2.2.3. Perfil de expressão das variantes de *RECK* durante os processos de diferenciação osteogência e adipogênica.

a. Perfil de expressão de *MMPS, TIMPs* e variantes de *RECK* durante o processo de diferenciação osteogência.

b. Perfil de expressão de *MMPS, TIMPs* e variantes de *RECK* durante os processos de diferenciação adipogênica.

3. Materiais e Métodos

3.1 Soluções e meios de cultura

Para células de mamífero:

DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

PBSA (Phosphate Buffered Saline – sem cálcio ou magnésio): solução salina tamponada pH 7,2, composta por NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 8mM e KH_2PO_4 1,5mM.

Tripsina: solução 0,1% de tripsina (Life Technologies) em PBSA contendo EDTA 1mM (pH 8,0).

Soro fetal bovino: SFB (Atená Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil).

Ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), concentração utilizada: 25mg/mL.

Estreptomicina (Sigma-Aldrich), concentração utilizada: 100mg/mL.

Para células bacterianas:

Meio líquido de cultura SOC (BD, NJ, EUA): 2% triptona, 0,5% extrato de levedura,10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl2, 20mM MgSO4, 20mM glicose.

Meio LB (Luria-Bertani, Gibco LB-Broth, Life technologies) : Triptona 10g/l; extrato de levedura 5g/l; NaCl 10g/l (pH 7,5).

LB-ágar: meio LB com 1,5g/l de ágar (Difco).

3.2. Linhagens celulares

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas para a realização deste estudo:

Células u87 MG (ATCC® HTB-14™): linhagem celular derivada de astrocitoma humano – grau IV, glioblastoma multiforme, isolada de um homem caucasiano de 44 anos (Ponten e Macintyre, 1968).

Células u373 MG (ATCC® HTB-17™): linhagem celular de astrocitoma humano – grau III, {de Ridder; 1987}. É importante ressaltar que esta linhagem celular foi retirada do banco da ATCC devido a questões levantadas quanto à sua autenticidade através de (comunicação de R.F. Petersson e E.G. Van Meir), através de ensaios de sequenciamento e de similaridades descritas entre a linhagem presente no banco da ATCC e a linhagem U251 (Ishii, Maier *et al.*, 1999) (segundo comunicado na página do ATCC - *http://www.atcc.org/support/faqs/cf245/U373%2bMG%2bATCC%2bHTB17-1055.aspx* - e Ishii, N., et al. Brain Pathol 9: 469-79, 1999).

Células 293T (ATCC® CRL-11268™): linhagem de rim embrionário humano, derivada de células HEK 293 após transformação com o antígeno *large T* de SV-40 (Dubridge e Calos, 1987).

Células 1205Lu (ATCC® CRL-2812™): linhagem derivada de metástase pulmonar de células WM793B (ATCC® CRL-2806™) após injeção subcutanea em camundongos imuno-deficientes. Por sua vez a linhagem WM793B é derivada de melanoma primário de lesão em fase de crescimento vertical (VGF – Vertical Growth Phase).

Células 293-F FreeStyle™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA): Linhagem derivada de células HEK 293 adaptada para crescimento em suspensão em meio definido FreeStyle™ 293 Expression Medium (Life Technologies) e otimizada para a produção de proteínas recombinantes.

Células HU-2, HU-4 e HU-5: linhagens de cultura primária de células-tronco dermais de pele humana isoladas e caracterizadas pela Dra. Maria Fernanda

Forni (Forni, 2013). Em resumo: biópsias de pele de pacientes do sexo masculino e de diferentes idades foram obtidas e os tecidos contaminantes, como gordura e vasculatura associadas, foram removidos. O tecido foi então incubado em dispase (100 unidades caseinolíticas/mL) por 30 min a 37°C para separação da derme da epiderme. A derme foi então cortada em pedaços de aproximadamente 5x5 mm e exposta à uma nova digestão com colagenase 10µg/mL (Serva, Heidelberg, Germany), e, posteriormente, o tecido foi submetido à dissociação mecânica em células únicas. O material foi lavado uma vez em DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*) 10% Soro Fetal Bovino (SFB) para inativação da enzima e duas vezes em PBSA (Phosphate Buffered Saline – sem cálcio ou magnésio, solução salina tamponada pH 7,2, NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 8mM e KH_2PO_4 1,5mM) para remoção de fragmentos celulares. As células foram então mantidas em frascos de cultura aderente em meio DME 10% SFB. As culturas primárias resultantes foram submetidas á separação por *sorting* em citômetro de fluxo (FACS Aria I/II, BD, NJ, EUA), utilizando-se, como marcadores: CD34, CD90 e CD105. As linhagens geradas foram caracterizadas segundo os marcadores recomendados pela *The International Society for Cellular Therapy* (Dominici, Le Blanc *et al.*, 2006), apresentando um perfil CD14, CD31, CD34 e CD45 negativo e CD29, CD44, CD90 e CD105 positivo, perfil típico de células-tronco mesenquimais (Forni, 2013).

3.3. Condições de cultura celular e manutenção

293-F FreeStyle (Life Technologies) foram mantidas em meio definido FreeStyle Expression Medium especifico para o tipo celular utilizado (Life Technologies) em suspensão à 37°C, 8% CO_2, em plataforma de agitação a 125 rpm e sob condições controladas de umidade. Para manutenção das culturas celulares, as mesmas foram subcultivadas em intervalos de aproximadamente três dias de modo a não atingirem uma densidade celular superior a 5.10^6 células/ mL conforme instruções do fornecedor.

Células u87 MG (e suas linhagens derivadas), HOG, u373 MG, 293T, **HU-2, HU-4 e HU-5** foram mantidas em meio DME (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*) (Life Technologies). 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Life Technologies), 25mg/mL ampicilina (Sigma-Aldrich) e 100 mg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas à 37°C, 2% CO_2 sob condições controladas de humidade.

Células 1205Lu foram mantidas em meio denominado Melanoma que consiste em meio MCDB153 (Sigma-Aldrich) acrescido de meio L-15 (Invitrogen, Carisbad, CA, EUA) na proporção de 4:1 suplementado com 2 mM $CaCl_2$, 5 µg/mL insulin (Sigma-Aldrich), 2% SFB (Invitrogen) e 1% estreptomicina/ampicilina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas à 37°C, 2% CO_2 sob condições controladas de humidade.

O meio de cultura das linhagens aderentes foi renovado a cada dois ou três dias de cultivo. Ao atingirem aproximadamente 80% da densidade de saturação, as culturas celulares foram lavadas com PBSA e subcultivadas utilizando-se solução de tripsina (EDTA 1mM (pH 8,0) e 0,1% de tripsina (Life Technologies) em PBSA).

De modo a estabelecer um estoque das linhagens celulares utilizadas e geradas neste estudo, as células foram congeladas em solução contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) estéril 10% SFB (Soro fetal bovino, Atená Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil) e 80% meio de cultura, na concentração mínima de $1x10^6$ células/ mL. As células, em seus meios de congelamento correspondentes, foram transferidas para a ampola de congelamento e incubadas por 15 minutos no gelo. Após este período, estas foram armazenadas a -80°C e, posteriormente em reservatórios contendo nitrogênio líquido a -190°C.

Para o descongelamento destas populações celulares, a ampola contendo a cultura de interesse foi retirada do reservatório a -80°C ou -190°C, descongelada e transferida para um tubo contendo 5mL do meio de cultura recomendado a 37°C. A suspensão com as células foi então centrifugada a 800 rpm (centrífuga de Bancada Baby®I, Modelo 206 BL, FANEM, Guarulhos, SP, Brasil) por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante, contendo DMSO, foi removido e o sedimento, composto pelas células, foi ressuspendido no meio de cultivo apropriado e mantidos em estufa com atmosfera de 2% CO_2 e a 37°C.

Todas as culturas celulares utilizadas neste estudo foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma spp.*, por reações de Nested-PCR em método desenvolvido pela Dra Ana Cláudia Oliveira Carreira e pela Ms Marluce Mantovani e baseado em Uemori e colaboradores (Harasawa, Koshimizu *et al.*, 1992).

3.4. Amostras de tecido

Amostras de tecido cerebral provenientes de lobectomia temporal de pacientes epiléticos e de ressecção de espécimes de astrocitomas foram macrodissecadas e imediatamente congelados (*snap-frozen*) em nitrogênio liquido, como previamente descrito (Oba-Shinjo, Bengtson *et al.*, 2005). Os espécimes foram categorizadas de acordo com a classificação da *World Health Organization* (WHO) segundo suas características histopatológicas (Louis, Ohgaki *et al.*, 2007). As amostras foram coletadas com a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) (CAPPesq, 691/05) e formulários de consentimento informado foram obtidos de todos os pacientes.

Human Normal Total RNA Master Panel II (Lot. No. 7090015, Clontech, Palo Alto, CA, EUA) foi utilizado como painel de RNA de tecidos humanos normais.

3.5. Extração de RNA

O RNA total das linhagens celulares e amostras tumorais utilizadas neste trabalho foi isolado utilizando-se colunas de sílica e metodologia disponibilizados pelo RNeasy® mini-kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em relação às linhagens, 5.10^5 células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro. Após os devidos tratamentos, estas células foram lisadas e seu RNA total foi extraído conforme instruções do fabricante.

A concentração do RNA preparado foi determinada através da quantificação em espectrofotômetro (ND-1000 Spectrophotometer,

NanoDrop Technologies). Para tanto, determinou-se a absorbância das preparações a 260ηm, considerando-se a correspondência entre uma unidade de absorbância neste comprimento de onda e a concentração de 40µg/mL de RNA. O grau de pureza do RNA foi estimado pela relação $Abs_{260ηm}/Abs_{280ηm}$, tendo-se, como pureza satisfatória, uma relação próxima de 2,0.

3.6. Amplificação por PCR e sequenciamento

3.6.1. Amplificação por PCR

De modo a confirmar a presença e identidade dos transcritos gerados por *splicing* alternativo de *RECK* e posteriormente clona-los para expressão em modelo celular de mamífero, foram desenhados *primers* para amplificação das regiões preditas de quadro aberto de leitura de cada um dos transcritos alternativos de *RECK.* Para tanto, o cDNA de células de astrocitoma u373 MG e de melanoma Lu1205 foram utilizadas como substrato da reação. A amplificação por PCR foi realizada utilizando-se a enzima Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) (1 U) e 3% de dimetilsufóxido (DMSO), a mistura reacional foi incubada a 98°C por 2 min (fase de desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos compostos por: incubação a 98°C por 10 segundos (fase de desnaturação); 52,6^{o}C (para amplificação de RECK-B) ou 53°C (para amplificação de RECK-D) ou 54°C (para amplificação de RECK-I) por 30 segundos (fase de anelamento dos *primers*), 72°C por 45 segundos (fase de extensão da reação de síntese de DNA); for fim foi realizada uma incubação final de 72°C por 5 minutos (fase de extensão final). Os *primers* utilizados foram desenhados com o programa

Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e validados em ambos BLAST e BLAT (Tabela 1). Os *primers* foram desenhados de forma a inserirem a 5' da sequência amplificada um sitio de restrição para a enzima XbaI e a 3' do fragmento amplificado um sitio de restrição para a enzima MluI de modo a facilitar a posterior subclonagem das sequenicias amplificadas. Os produtos de PCR foram então resolvidos em gel de agarose 1% e purificados através do Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) segundo instruções do fabricante.

Tabela 1: Sequência dos oligonucletídeos utilizados para amplificação da região codificante dos transcritos gerados por splicing *alternativo de* RECK

	Variante alvo	*Sequência dos Primers (5'→3')*
PCR de Amplificação	*RECK-B*	Forward -ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCT Reverse – TTTGGTCAGTTTGGTCAATCA
	RECK-D	Forward -ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCT Reverse – AGGTGCAGCTTCATCAGGAG
	RECK-I	Forward -ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCT Reverse – CTGCCATCTCCTTAGCTCCA

3.6.2. Clonagem no vetor pGEM®-T Easy

O vetor pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI) é um sistema otimizado para a clonagem de produtos de PCR, sendo, por esse motivo utilizado como primeira abordagem para a clonagem dos produtos de amplificação da região do quadro aberto de leitura dos transcritos gerados por *splicing* alternativo de *RECK,* visando seu sequenciamento e subclonagem nos vetores de expressão utilizados neste trabalho. 7 µL destes produtos já purificados foram submetidos seguinte reação: 1 µL Taq Polimerase Reaction Buffer

(Thermo Scientific,), dATP 0,2 mM, Taq Polimerase (5 U, Thermo Scientific). A mistura reacional foi então incubada a 70°C por 30 minutos.

3.6.3. Reação de ligação

Para ligação dos produtos de PCR no vetor pGEM®-T Easy, , foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (5U, New England Biolabs® Inc., Ipswish, MA, EUA). A reação foi realizada a 16ºC por 18h, seguida da inativação enzimática a 65ºC por 15 min. Na mistura reacional, utilizou-se a razão estequiométrica inserto: vetor de 5:1.

3.6.4. Transformação bacteriana com DNA plasmideal

3.6.4.1. Obtenção de bactérias eletrocompetentes

Bactérias *E. coli* da cepa XL1-blue foram inoculadas em 5 mL de meio LB – ampicilina e incubadas a 37°C por 16-18 horas sob agitação (300 rpm). No dia seguinte, dilui-se a cultura na proporção de 1:100 em 20 mL de meio LB e incubou-se a cultura a 37°C sob agitação até atingir-se a Absorbância de 0,5 -0,8 em 600ηm (fase exponencial de crescimento). A cultura foi então centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em 20 mL de água Milli-Q gelada. Repetiu-se esse ultimo passo por 3 vezes para remoção do excesso de sal na solução. Por fim, ressuspendeu-se o sedimento celular em 400 µL de solução 10% glicerol e foram feitas alíquotas de 50 µL, estocadas a – 80°C.

3.6.4.2. Transformação bacteriana por eletroporação, estocagem e amplificação do DNA plasmideal

De modo a possibilitar o sequenciamento das variantes alternativas de *RECK,* 2 a 4 µL de cada reação de ligação descrita no item 3.6.3. foram misturadas a 50 µL da suspensão de bactérias eletrocompetentes e estas foram eletroporadas em uma cubeta a 2800 V.

Após a eletroporação, 300 µL de meio de cultura SOC foram adicionados e a suspensão de bactérias foi transferida para um tubo eppendorf. As culturas foram então incubadas a 37°C em banho seco por 1 hora. Por fim, 100 µL de cada cultura bacteriana foram semeados em placa LB-Agar contendo 50 µg/ mL de ampicilina.

Os clones bacterianos obtidos foram expandidos em meio LB e incubados em meio LB a 37 ^{o}C por 16-18 horas sob agitação (300 rpm). Estoques celulares foram estabelecidos para manutenção em -80 ^{o}C, para tanto, adicionou-se a suspensão celular uma solução glicerol 30 % na proporção de 1:1 (v:v).

Para purificação de DNA plasmideal utilizou se o kit GeneJET Palsmid Miniprep (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante. Ao final do protocolo, a concentração do plasmídeo foi determinada através da medida de sua absorbância em 260 ηm em espectrofotômetro (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies).

3.6.5. Reação de sequenciamento pelo método de Sanger

Para determinação da identidade dos produtos de PCR correspondentes às variantes de *RECK*, os produtos de PCR inseridos no vetor pGEM®-T Easy foram sequenciados pelo método de Sanger (Sanger, Donelson *et al.*, 1973). O método de Sanger se utiliza do uso de dideoxirribonucleotídeos (ddNTPs) acoplados a diferentes fluoróforos na mistura reacional do PCR. Estes ddNTPs impedem a incorporação subsequente de deoxirribonucleotídeos, interrompendo a reação de polimerização do DNA em diferentes pontos. Os produtos da reação são então submetidos à eletroforese capilar e a informação de tamanho do produto aliada ao fluoróforo detectado e, portanto, ao ddNTP incorporado, permitem a montagem do *contig*, sequência de DNA do fragmento analisado. Para tanto, *primers forward* e *reverse* fornecidos pelo sistema pGEM®-T Easy vector (Promega) foram utilizados. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se 200 ng do plasmídeo a ser analisado como substrato e o kit *BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction* (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante, Big Dye Mix 2 µL, Sequencing Buffer 1x, primer *forward* ou *reverse* 0,25 µM, para um volume final de 20 µL. A mistura reacional foi incubada a 96°C por 2 minutos, submetida a 40 ciclos constituídos de: incubação a 96°C por 45 segundos; 55 ^{o}C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Posteriormente, as reações foram precipitadas adicionando-se a cada tubo reacional 33 µL da solução de precipitação (etanol 90%, acetato de sódio pH 5,2 0,3 M, glicogênio 3.3 µg/ mL), agitando-se a placa com auxilio de vortex e incubando-se a mesma a 4°C por 15 minutos. Após esse

período, a placa foi centrifugada a 3.000g por 20 minutos a 20°C. Descartou-se o sobrenadante e, para lavagem do precipitado, adicionou-se 50 µL de etanol 70% por tubo reacional e centrifugou-se a placa por 10 minutos a 3.000g a 20°C, descartando-se novamente o sobrenadante por inversão da placa. Por fim, adicionaram-se 150 µL de solução 70% isopropanol por poço, a placa foi submetida à uma centrifugação a 3.000 g e 20 ºC por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante invertendo-se a placa e a centrifugando invertida a 700g. A placa foi então incubada a 37 ºC por 10 minutos para total evaporação do isopropanol. As amostras foram submetidas à eletroforese capilar no sequenciador ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Através dos cromatogramas originados, foram gerados segmentos de DNA sobrepostos (*contigs*) pela ferramenta Phrap, seguido da análise de qualidade pelo programa Phred.

3.7. Clonagem em vetores plasmideais

Para realização deste trabalho três estratégias de vetores de expressão em células de mamífero foram gerados para possibilitar o estudo funcional das isoformas alternativas de RECK. Os vetores utilizados foram TOPO pcDNA 3.3 (Life Technologies), pEGFP-N1 (descontinuado, Clontech) e p156RRLsinPPCCMVIns3IRESPRC (Verma, Salk Institute for Biological Studies - CA), que será daqui para frente denominado pLV.

3.7.1. Vetores de expressão pLV

Os fragmentos correspondentes ao quadro aberto de leitura das isoformas alternativas *RECK-B*, *-D* e *-I*, sub-clonadas no vetor pGEM®-T Easy, foram

submetidos a uma reação de digestão com as enzimas de restrição MluI e XbaI (Thermo Scientific), utilizando-se tampão R 1x, sob incubação a 37°C por 3 horas e inativação das enzimas a 80ºC por 20 minutos. A região do quadro aberto de leitura de *RECK* canônico foi amplificado por PCR do vetor PCXN2-hRECK (gentilmente cedido pelo Prof. Makoto Noda, Universidade de Kyoto, Japão), nas mesmas condições descritas em 3.6.1. Os produtos de clivagem dos vetores pGEM®-T Easy e o produto de PCR da região codificadora de *RECK* canônico foram fracionados por eletroforese em gel de agarose, as bandas correspondentes aos fragmentos digeridos foram extraídas e o DNA purificado, utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). As sequências codificadoras foram então subclonadas no vetor pLV, vetor plasmideal de transferência lentiviral de terceira geração que possui como gene repórter a *enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) (Tiscornia, Singer *et al.*, 2006b; a). Para tanto, o vetor pLV foi digerido com XbaI e MluI para posterior ligação com os insertos correspondentes às variantes de *RECK.* Para ligação com o inserto correspondente a variante canônica de *RECK,* tratou-se o vetor com EcoRV (Thermo Scientific) utilizando-se tampão R 1x, sob incubação a 37°C por 3 horas e inativação das enzimas a 80ºC por 20 minutos, seguido do tratamento com FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U, Thermo Scientific) por 10 minutos a 37ºC seguido de 5 minutos a 75ºC para inativação da enzima, de modo a desfosforilar o vetor e diminuir sua taxa de recircularização. Realizou-se a ligação conforme já descrito (item 3.6.3.). Originando os vetores pLV-RECK, pLV-RECK-B, pLV-RECK-D e pLV-RECK-I. Para seleção dos clones

bacterianos repetiu-se a dupla digestão para se confirmar a inserção do fragmentos correspondentes.

3.7.2. Vetores de expressão TOPO cDNA 3.3

Uma segunda estratégia para a detectação das isoformas alternativas de *RECK* foi perseguida visando sua posterior purificação. Utilizou-se o vetor TOPO pcDNA 3.3 (Life Technologies) para expressar as proteínas caracterizadas fusionadas a uma cauda de oito histidinas em sua porção C-terminal. Para tanto, *primers* foram desenhados de modo a adicionar uma sequência codificadora para oito histidinas anteriormente ao *stop codon* na região codificadora dos transcritos (Tabela 2). Utilizou-se como substrato 200ng das construções no vetor pGEM®-T Easy, e seguiu-se o protocolo em 3.6.1. O vetor TOPO pcDNA 3.3 é fornecido linearizado, com um timidilato livre nas extremidades 3´do vetor e, ligado covalentemente a ela, está a Topoisomerase I de *Vaccina virus.* A Topoisomerase I se liga a regiões especificas do DNA (5´- CCCTT – 3´) quebrando a ligação fosfodiester na extremidade 3´da sequência (Shuman, 1991) e formando uma ligação covalente com o fosfato 3´ da fita de DNA rompida e o resíduo tirosina (Tyr-274) da enzima. Essa ligação pode ser revertida pelo grupo hidroxila livre da extremidade 5´da fita rompida (Shuman, 1994) ou do produto de PCR a ser clonado. Deste modo, a ligação dos produtos de PCR no vetor foi realizada utilizando-se o kit TOPO cloning reaction (Life Technologies), no qual incubou-se 1 μL do vetor, 4 μL do produto de PCR e 1 μL de solução salina fornecida pelo Kit, a temperatura ambiente por 10 minutos. A seleção dos clones bacterianos se deu por reações de sequenciamento.

Tabela 2: Sequência dos oligonucletídeos utilizados para amplificação da região codificante dos transcritos gerados por splicing *alternativo de* RECK *acrescentando-se uma cauda de histidina na porção C-terminal das proteínas*

	Variante alvo	*Sequência dos Primers (5'→3')*
PCR de Amplificação	*RECK-B*	Forward -ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCT Reverse – TTAATCACTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGGTGGTCAGTTTTTATAAATCTGG
	RECK-D	Forward -ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCT Reverse – TTAATCACTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGGTGCAAAAGTAATAATTGCTCATTGG
	RECK-I	Forward -ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCT Reverse – TTAATCACTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGGTGAATGTCAGAGAGCACAGATCTG

3.8. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

5´-RACE and 3´-RACE foram realizados baseados nos protocolos dos kits 5´and 3´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen – Life Technologies).

Para o 5´-RACE, a primeira fita de cDNA foi gerada pela transcrição reversa de RNA poly(A)$^+$ de células de astrocitoma u373 MG e de melanoma 1205Lu utilizando-se o *primer* 5´-cDNA synthesis (CDS), juntamente com *primers* específicos para a sequência de cada transcrito (Tabela 3). Para o 3´-RACE, a fita de cDNA foi gerada utilizando-se o *primer* 3´-CDS, juntamente com *primers* específicos para a sequência de cada transcrito (Tabela 3). Os primers foram desenhados utilizando-se o software Primer3

(http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e validados utilizando-se BLAST e BLAT. Os produtos de PCR foram purificados, subclonados no vetor pGEM-T Easy plasmid (Promega), e sequenciados utilizando-se o Kit BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabela 3: Sequência dos oligonucletídeos utilizados para amplificação da região das extremidades não codificantes dos transcritos gerados por splicing *alternativo de* RECK *acrescentando-se uma cauda de histidina na porção C-terminal das proteínas*

	Variante alvo	*Sequência dos Primers (5'→3')*
5' RACE PCR	*todas*	GCAATAGCCAGTTCACAG
	todas	CAGCGCACCTCGCAGAGA
3`RACE PCR	*RECK-B*	ACCCAACGGATAGGCCTCCT
	RECK-D	GGAACCCAACGGATATGTTTGA
	RECK-I	GGAACCCAACGGATAGCAGAT

3.9. RT-PCR quantitativo

3.9.1. Síntese de cDNA

Amostras de RNA total, extraídas conforme descrito no ítem 3.3, foram utilizadas como molde para a síntese de cDNA, em reações de transcrição reversa. Alíquotas de 1 μg de RNA total foram primeiramente incubadas por 10 minutos à 37°C, com 2 μL de DNase I (1U/μL, Fermentas - Thermo Scientific), em solução contendo 2 μL de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Life Technologies) para as amostras de pacientes humanos e Improm II (Fermentas – Thermo Scientific) para as amostras de RNA provenientes das linhagens celulares e 0,5 μL de RNase OUT™ (40U/μL, Life Technologies) em volume final de 10 μL.

Posteriormente, esta enzima foi inativada por aquecimento à 75°C por 10 minutos. A cada amostra de RNA previamente tratado foram adicionados 1 μL de Oligo dT (0,5 μg/μl, Life Technologies) e 1 μL de dNTP (10 mM, Life Technologies), obtendo-se um volume final de reação de 12 μL. Em seguida, as amostras foram incubadas à 65°C por 10 minutos, para desnaturação das moléculas, e imediatamente colocadas no gelo. Adicionaram-se então 8 μL de uma solução contendo 2 μL de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Life Technologies) ou para a enzima Improm II (Thermo Scientific) suplementado com $MgCl_2$, 2 μL de DTT (0,1 M, Life Technologies), 0,5 μl de RNase OUT™ (40 U/μl, Life Technologies) , 1 μL da enzima SuperScript™ III (200 U/μl, Life Technologies) para as amostras de RNA provenientes de pacientes e 1μL da enzima Improm II (200 U/μl, Thermo Scientific) para as amostras de RNA provenientes de linhagens celulares e 2,5μL de água Milli-Q®, para um volume final de reação de 20μL. As amostras foram incubadas à 25°C por 10 minutos, para anelamento dos *primers* e, posteriormente, à 50°C por 2 horas, para síntese dos cDNAs. Em seguida, a enzima transcriptase reversa foi inativada por meio da incubação das amostras a 72°C por 10 minutos. Para a degradação das moléculas de RNA molde, adicionou-se 1 μl de RNase H (5 U/μl, Fermentas – Thermo Scientific). As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, a 72°C por 10 minutos, para inativação da enzima. Posteriormente, as amostras foram diluídas 3 vezes em água Milli-Q®.

3.9.2. Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes expressos nos experimentos de RT-PCR quantitativo foram desenhados com o auxílio do software *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems). As principais características dos oligos desenhados por este programa são: amplificação de fragmentos com tamanho entre 50-150bp, quantidade de CG entre 30 e 80%, incapacidade de formação de dímeros ou de estrutura secundária e temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C. Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, e possibilitar a discriminação entre os transcritos alternativos de *RECK*, os pares de iniciadores foram desenhados em exons diferentes para cada um dos transcritos analisados e, no caso dos transcritos alternativos de *RECK*, na junção dos exons 8 e 9 de modo a serem específicos a cada variante (Tabela 4).

3.9.3. Determinação da concentração final de *primers*

Previamente aos ensaios de qRT-PCR propriamente ditos, a concentração de cada um dos pares de iniciadores utilizados foi padronizada. Para tanto, reações contendo *primers* em concentrações finais de 800 a 100nM foram realizadas, utilizando-se como molde uma mistura de cDNAs das amostras tumorais. Desta forma, determinou-se a menor concentração final de *primers* necessária para a amplificação do produto de interesse, sem que houvesse variação no valor do Ct e no perfil da curva de amplificação gênica, além da mínima ou inexistente formação de dímeros.

Tabela 4: Seqüência dos oligonucletídeos utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo

Transcrito alvo	*Sequência dos Primers (5'→3')*
RECK	Forward – GTGCCGTGATGTATGTGAACAGATT
	Reverse – GCAACAGATGTTTTAGTCGGGATTC
RECK-B	Forward – TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA
	Reverse – CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC
RECK-D	Forward – AATGAGGAACCCAACGGATATGT
	Reverse - TCAGGCTCTCTTCTCATTGTTATGACT
RECK I	Forward – ATGAGGAACCCAACGGATAGCAG
	Reverse – GCCATCTCCTTAGCTCCAGCAGTA
MMP-2	Forward – AGCTCCCGGAAAAGATTGATG
	Reverse – CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT
MMP-9	Forward – CACGCACGACGTCTTCCA
	Reverse – AAGCGGTCCTGGCAGAAAT
MMP-14	Forward – GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA
	Reverse – TCGAACATTGGCCTTGATCTC
TIMP-1	Forward – CCGCAGCGAGGAGTTTCTC
	Reverse – GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA
TIMP-2	Forward – CGACATTTATGGCAACCCTATCA
	Reverse – GGGCCGTGTAGATAAACTCTATATCC
TIMP-3	Forward – ATCACCTGGGTTGTAACTGCAA
	Reverse – CGCTCCAGAGACACTCGTTCTT
TIMP-4	Forward – GCACCCTCAGCAGCACATCT
	Reverse – CACTGGCCGGAACTACCTTCT
GAPDH	Forward – ACCCACTCCTCCACCTTTGA
	Reverse – CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
HMBS	Forward – TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT
	Reverse – CAACAGCATCATGAGGGTTTTC
HPRT	Forward – TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG
	Reverse – GGCCTCCCATCTCCTTCATC

3.9.4. Determinação da eficiência dos *primers*

Reações de amplificação, contendo *primers* numa concentração ideal, foram realizadas utilizando-se como *template* uma mistura de cDNAs provenientes das amostras de pacientes. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logarítimo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em y = ax+b) que foi utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/coeficiente\ angular}$$

$$Ef\ (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

3.9.5. Reação de RT-PCR quantitativo

Para a quantificação do produto formado durante a reação de RT-PCR quantitativo utilizou-se o corante SYBR® Green Dye (Life Technologies). Este reagente apresenta intensidade de emissão de fluorescência significativamente aumentada quando ligado à dupla fita de DNA. Dessa forma, quando livre em solução, o SYBR® Green Dye emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520ηm. Entretanto, ao intercalar-se à dupla fita de DNA, devido à sua afinidade pelo sulco menor do DNA, tem-se um aumento de fluorescência da ordem de 100 vezes, permitindo a detecção do produto do qRT-PCR.

Como molde, foram utilizados 3 μL do cDNA (sintetizado conforme descrito no item 3.9.1) diluído 30 vezes em água Milli-Q®. Além disso, para cada uma das reações de RT-PCR quantitativo, adicionou-se 3 μL da mistura de *primers* (*forward* e *reverse*), na concentração final previamente

determinada, e 6 μl do reagente SYBR® *Green Dye*. Todas estas reações de PCR foram realizadas em triplicata, no termociclador 7300 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As condições das reações foram: 50°C por 2 minutos (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase, AmpEraser), 95°C por 10 minutos (etapa de ativação da enzima DNA Polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C de 15 segundos (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 minuto (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do amplicon). Para o gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foi utilizado o programa computacional 7300 *System Software* (Applied Biossystems).

3.9.6. Confirmação da expressão diferencial

Dado que o reagente SYBR® Green Dye intercala-se inespecificamente em DNA dupla-fita, tanto a presença de amplificação inespecífica e contaminações, como a formação de dímeros de iniciadores, poderiam interferir na intensidade de fluorescência medida pelo aparelho. Dessa forma, a especificidade do sinal obtido foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado e, em alguns casos, através da corrida do produto da reação em gel de poliacrilamida. Sabe-se que, quando a temperatura da amostra atinge a temperatura de desnaturação (Tm) do produto amplificado, o mesmo se desnatura e o corante se dissocia do DNA, diminuindo a intensidade da fluorescência detectada pelo aparelho. Assim sendo, ao término da reação de qRT-PCR, elevou-se gradativamente a temperatura das amostras e mediu-se a intensidade da fluorescência. A partir destes dados, uma curva de dissociação do produto foi gerada. Como

produtos de diferentes tamanhos e composição de bases apresentam diferentes Tms, esta curva possibilita a distinção entre diferentes produtos amplificados na reação, a presença de amplificação no controle negativo e a formação de dímeros de *primers*.

Na análise inicial dos dados, realizada através do programa GeneAmp 5700, definiu-se um *threshold* na fase exponencial de amplificação do gene. Assim que foi estabelecido o *threshold*, a partir da intersecção deste com a curva de amplificação obteve-se o Ct da amostra (*Threshold cycle,* ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*). Desta forma, para determinação do Ct de cada reação foi determinado manualmente um ponto de corte (*threshold*) de 0,1.

Em experimentos de *Real-Time PCR*, deve-se considerar a possibilidade da variação da concentração inicial de cDNA na análise dos dados provenientes de duas ou mais amostras. Desta forma, para que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam previamente normalizados. Assim, para cada amostra de cDNA analisada, foram realizadas duas reações, sendo uma utilizando *primers* para o gene-alvo e, a outra, utilizando *primers* para um gene de expressão constitutiva, o qual atuou como controle interno da quantidade de cDNA utilizada nas reações. Por fim, a expressão do gene-alvo foi determinada em função da expressão do gene-controle.

De posse dos Cts, inicialmente, foi calculada a média dos Cts das duplicatas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação à uma amostra, que é tomada como referência, calculou-se, então, a diferença entre a Média dos Cts da amostra referência e a Média dos Cts da amostra

estudada. Esta diferença foi definida como ΔCp. O cálculo do ΔCp foi realizado para os dados do gene-alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final (Pfaffl, 2001) para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos *primers* utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{Ef_{\text{gene alvo}}^{\Delta CP_{\text{gene alvo}}}}{Ef_{\text{controle endógeno}}^{\Delta CP_{\text{controle endógeno}}}}$$

Um fator de normalização foi gerado através do software geNorm, utilizando como genes de expressão endógena *GAPDH, HPRT* e *HMBS*. Substituindo o divisor da equação anterior. O resultade desta é o valor de expressão relativa de cada transcrito analisado.

3.10 Transfecção celular transitória

Para culturas aderentes, 1.10^6 células foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro em um período de 24 horas antes da transfecção. Prepararam-se duas soluções: a primeira continha 2 µg de DNA plasmideal (construções para expressão das variantes de RECK em TOPO cDNA 3.3) em 250 µL de DMEM, e a segunda 8 µL do reagente Lipfectamine 2000 (Life Technologies) em 250 µL de DMEM. As duas soluções foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos (incubação necessária para a formação de vesículas responsáveis pela transfecção) . Após esse período a mistura foi adicionada ao meio de cultura das células a serem transfectadas (1,5mL de DMEM 10% SFB). Após 6 horas o meio de cultivo foi

trocado e a coleta do extrato celular e meio condicionado foi realizada após 96 horas.

Para culturas em suspensão (células Cho-S e 293-F), as culturas foram diluídas a 1.10^6 células/ mL para um total de 30 mL. Duas soluções foram preparadas: a primeira consistia de 37,5 µL de MAX Freestyle Transfection Reagent (Life Technologies) em 600 µL de meio especifico, e a segunda consistia de 37,5 µg de DNA plasmideal em 600 µL de meio especifico. As duas soluções foram misturadas e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e adicionadas a cultura celular. A coleta de meio condicionado e extrato celular se deu 4 dias apos a transfecção.

3.11. Estabelecimento de linhagens de celulares estáveis de Glioblastoma humano superexpressando RECK, RECK-B, -D ou –I

De forma a gerar linhagens estáveis derivadas de u87 MG superexpressando cada uma das variantes de *RECK*, utilizou-se o sistema de transdução lentiviral e as construções pLV geradas. O sistema utilizado é de terceira geração, se utilizando de 3 vetores diferentes para codificação das proteínas virais e um vetor de expressanção contendo a região codificante de interesse. No sistema utilizado, o empacotamento viral emprega a formação do envelope viral heterólogo Vesicular *Stomatitis Virus G Glicoprotein* (VSVG), que apresenta alta capacidade de transdução em uma vasta diversidade de células. O vetor pMDL codifica as proteínas Gag e Pol e o vetor pREV codifica a proteína Rev, que regula a expressão lentiviral pós-transcricionalmente.

3.11.1. Vetores utilizados

Os vetores estruturais utilizados neste trabalho para a produção viral foram cedidos pelo Dr. Inder Verma (Salk Institute for Biological Studies - CA).

Vetores estruturais:

- pMDL: vetor codificante para as seqüências gag e pol

- pREV: vetor codificante para a proteína Rev, responsável pela exportação do RNA viral para o citoplasma

- pVSVG – vetor codificante para a proteína VSVG do envelope viral

Vetores lentivirais:

Foram utilizados as construções pLV-RECK, pLV-RECK-B, pLV-RECK-D, pLV-RECK-I e o vetor vazio pLV, descritos anteriormente.

3.11.2. Produção viral

Foram plaqueadas 1.10^6 células 293T em placas de 35 mm. No dia seguinte, os seguintes plasmídeos foram usados para transfectar as células 293T, na seguinte proporção:

- pMDL: 3,3 µg;
- pREV: 1,3 µg;
- pVSVG: 1,8 µg;
- Construção pLV de interesse: 2 µg.

No total, 8,4µg de DNA e 10µl de lipofectamina 2000 foram utilizados para cada transfecção (descrita no item 3.11.1). O meio utilizado durante a transfecção foi DME 10% soro HyClone, na ausência de antibióticos. Após 5h do início da transfecção, o meio de cultura foi substituído por 2 mL DMEM 10% HyClone, adicionado de antibióticos. O meio condicionado de cada condição (suspensão viral) foi, então, coletado a cada 24h, filtrado em filtro de 0,45µm para a retirada de debris celulares, aliquotado e congelado a -70°C.

3.11.3. Titulação viral

Células 293T foram plaqueadas em placas de 6 poços (10^5 células/ poço). No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por 2 mL de DMEM 10% SFB contendo diluições seriadas da suspensão viral, sendo elas: 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}. Após 48h, o meio foi retirado das placas e foi adicionado PBSA. As células foram então observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon TE-300) com filtro para o fluoróforo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). As células foram então submetidas a ação da tripsina e as células foram contadas na luz visível e sob filtro para FITC.

Para o cálculo do título viral, a porcentagem de células EGFP positivas na suspensão celular foi multiplicado pelo inverso do fator de diluição da suspensão viral, multiplicado pela diluição inicial da suspensão e dividido por 100. Desta forma, foi determinado o nível de unidades infecciosas (IU) por mL da suspencão viral (IU/ mL). Cada unidade infecciosa se refere à mínima quantidade viral capaz de transduzir uma célula suscetível.

Para a transdução das células de interesse, foi levado em conta o MOI (*multiplicity of infection*) de cada tipo de vírus produzido. O MOI representa a relação entre unidades infecciosas por célula (IU/ célula).

3.11.4. Transdução celular por lentivírus

Foram plaqueadas 3.10^4 células U87 MG por poço de placas de 12 poços e, no dia seguinte, foram adicionados volumes de suspensão viral equivalentes a MOI 100. As populações celulares foram re-infectadas uma vez, num intervalo de 24h e, então, foram expandidas. Para o enriquecimento da população para células EGFP positivas, quando necessário, as células foram submetidas a uma seleção por *sorting* utilizando-se o citometro FACS Aria I/II (BD Biosciences).

3.11.4.1 Seleção da população transduzida através de *Sorting* em citometria de fluxo

O processo de separação de células transduzidas baseou-se na expressão de EGFP, repórter presente no vetor pLV, proporcional a emissão de fluorescência pelas células, sendo seu pico de excitação a 488nm (laser azul) e seu pico de emissão em 509 nm. As células foram submetidas à uma voltagem de 600V nas placas defletoras sendo separadas do restante da população. A separação foi realizada de maneira automática no próprio programa FACSDiva 6.0 do citometro FACS Aria I/II (BD Biosciences). Controles de CST para a estabilidade dos fotomutiplicadores e Drop-delay foram realizados sempre a cada novo experimento e a pureza das preparações foi aferida após o procedimento através da análise de uma

alíquota do *pool* de células separadas, de modo que as populações finais apresentassem pureza igual ou maior que 96% (estratégia de populações ilustrada na Figura 3). Cerca de 1.10^8células foram diluídas em 1 mL de PBSA e submetidas ao procedimento.

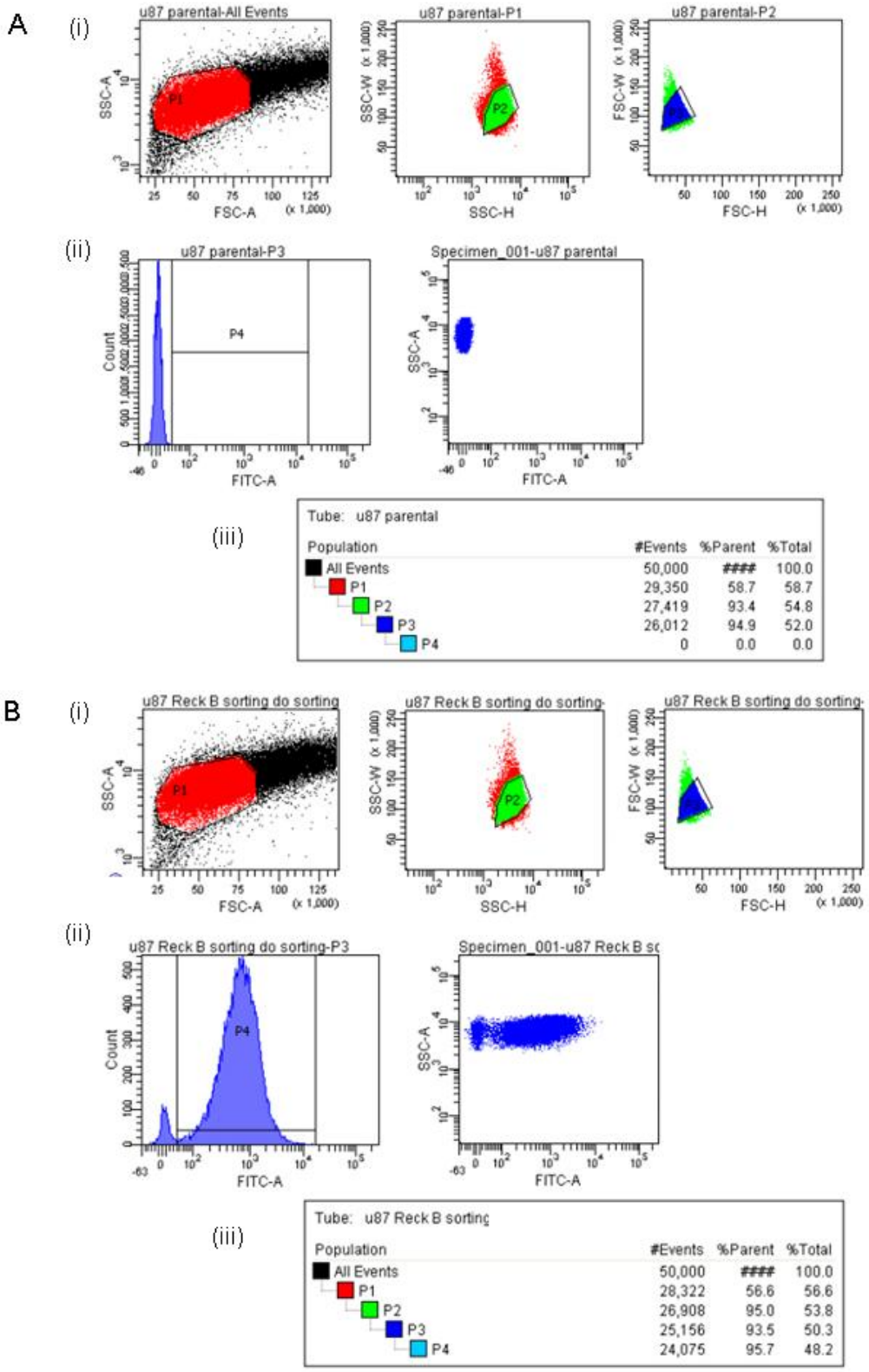


Figura 3: Enriquecimento da população EGFP positiva por *sorting*. Experimento representativo para ilustrar a estratégia de *sorting* adotada para a seleção de células EGFP positivas correspondentes às células expressando constitutivamente as isoformas de RECK, ilustrando células U87 MG (A) e células U87 pLV-RECK-B (B). Para aumentar a eficiência e pureza

da subpopulação desejada, excluiram-se eventos que correspodenderiam a fragmentos ou agregados celulares através do estabelecimento do *gate* P1, e da discriminação de *doublets* pelo estabelecimento dos *gates* P2 e P3, itens (i). Por fim, o critério de seleção foi o *gate* abrangendo células com intensidade de fluorescência (FITC) maior do que a autofluorescência natural de células U87 MG (P4) (ii). (iii) representa a população de eventos contida em cada *gate* gerado.

3.12. Curva de crescimento celular

Foram plaqueadas $5x10^4$ células em placas de 35mm de diâmetro, foram utilizadas 15 placas por linhagem analisada. As placas foram mantidas em condições adequadas de cultura e o meio de cultivo foi renovado a cada dois dias. Realizaram-se diferentes coletas para cada linhagem celular analisada, realizadas a 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o plaqueamento, em triplicata. A coleta consiste na lavagem das placas com PBSA e posterior incubação com 0,2mL de solução de tripsina. Depois de constatado que as células se encontravam em suspensão, adicionou-se 0,8mL de PBSA. Em seguida, o número de células em suspensão foi imediatamente determinado com o auxilio do hemocitômetro. Para análise foi considerado somente o número de células vivas presentes em suspensão.

3.13. Ensaio de formação de colônia em meio semi-sólido (suspensão de agarose)

A tumorigenicidade das linhagens geradas, que superexpressam cada uma das variantes de *splicing* de *RECK* oi analisada através de ensaios de crescimento em suspensão de agarose (Agarose Medium EEO, Fisher). Poços de placas de 24 poços foram revestidos com 500 µL de agarose 0,6%

em DME, 10% SFB. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de suspensão celular em DME 10% SFB nas concentrações de 1.10^5 e 1.10^4 células/ mL em triplicata. Por fim foram adicionados 500 µL de agarose 0,3% em DME, 10% SFB. Após 24 horas, foram adicionados 500 µL de DME 10% SFB, sendo este meio de cultura trocado a cada 3 dias. Vinte e um dias após o plaqueamento, as colônias celulares formadas foram fixadas com a adição de 100 µL de formaldeído 37%, fotografadas e contadas em microscópio invertido EVOS FL (Life Technologies).

3.14. Ensaios de migração celular *in vitro*

O potencial migratório das linhagens superexpressando as variantes de RECK foi analisado utilizando-se duas diferentes abordagens *in vitro*.

3.14.1. Ensaio de migração celular *in vitro* por Transwell

A primeira abordagem envolveu a utilização de insertos de cultura celular do tipo Transwell™ (BD Bioscience) em poços de placa de 24 poços. Os insertos em questão apresentam uma membrana de PET com poros de 8 mm de diâmetro. Foram plaqueadas $1x10^4$ células na superfície superior da membrana porosa do inserto, em 500 µL de meio DME 0% SFB, e, no recipiente abaixo do inserto, adicionou-se 500 µL de meio DME 10% SFB, o qual atua como quimioatraeante para as células.

Após 24h, os insertos foram retirados da placa de 24 poços. As células foram fixadas por 20 min em formaldeído 37%, lavadas duas vezes em PBSA, permeabilizadas por 2 min em metanol absoluto, lavadas duas vezes em PBSA e

posteriosmente coradas em solução de Coomassie Blue (Sigma-Aldrich) 0,125% em Metanol:Ácido Acético:Água (45:10:45, v/v/v) (Merck) por 2min. O excesso de corante foi retirado lavando-se os insertos duas vezes em PBSA. As células que não migraram neste período foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão (Cotonete®). Após a secagem, as células aderidas a outra face do inserto foram contadas em microscópio invertido EVOS FL (Life Technologies) utilizando-se lentes objetivas de 10x. Foram contadas todas as células presentes no inserto ou no caso do número exceder 60 células por campo, cinco campos representativos de cada um dos insertos foram considerados. Realizou-se duplicata para cada uma das condições experimentais em três experimentos independentes.

3.14.2. Ensaio de migração celular *in vitro* por *scracthing (wound-healing)*

As linhagens de glioblastoma superexpressando cada uma das variantes de *RECK* foram plaqueadas a 1.10^5 células por poço em placas de plástico de 24 poços. Após atingirem confluência, o meio de cultura foi aspirado e um risco contínuo foi feito na placa com uma ponteira de 200 µL. O poço foi então lavado uma vez com PBSA para a remoção de detritos celulares (Liang, Park *et al.*, 2007). Imagens do mesmo campo de cada poço foram tiradas em microscópio EVOS (Life Technologies) em aumento de 4x de hora em hora por 6h. As análises foram realizadas medindo-se a área do risco em unidades arbitrárias (u.a.) nas imagens utilizando-se o software ImageJ (NIH, MD, EUA) para cálculo de taxa de migração. Realizou-se triplicata para cada uma das condições experimentais em três experimentos independentes.

3.15. Ensaio de invasão celular *in vitro*

De forma a avaliar a capacidade invasiva das linhagem u87 MG superexpressando as variantes de *splicing* de *RECK*), ensaios de invasão *in vitro* foram realizados utilizando-se insertos do tipo Transwell™ revestidos com MATRIGEL® (BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber, BD Bioscience).

Foram plaqueadas $1x10^4$ células na superfície superior da membrana porosa revestida do inserto, em 500 µL de meio DME 0% SFB, e, abaixo do inserto, adicionou-se 500 µL de meio DME 10% SFB, que atuou como quimioatratante para as células.

As células capazes de degradar o MATRIGEL® e migrar para a superfície oposta da membrana porosa foram então fixadas, coradas e contadas de acordo com oesquema previamente descrito no item 3.15.1.

3.16. Zimografia

As atividades *in vitro* das metalloproteases MMP-2 e MMP-9, em suas formas ativas e pró-enzima, foram avaliados por meio da realização de ensaios de Zimografia. As amostras de meio condicionado, provenientes de células u87 MG superexpressando cada uma das variantes de *RECK* e submetidas a diferentes condições de tratamento, foram concentrados com o auxilio de colunas Centricon Plus-70, Ultracel-PL Membrane, 10 kDa (Merck, Millipore, EUA) e fracionadas por eletroforese em géis verticais contendo 10% poliacrilamida – SDS, co-polimerizados com o substrato destas enzimas,

0,1% colágeno tipo I desnaturado (Gelatina Tipo A, Sigma-Aldrich). Após a eletroforese, os géis foram lavados sob agitação, a temperatura ambiente, com solução aquosa 2,5% Triton X-100, por 1h. Após a lavagem, estes géis foram incubados a 37°C, em solução contendo 50mM de tampão Tris (pH 8.5) e 10mM de $CaCl_2$, por 48h, para ação da enzima sobre o substrato. Posteriormente, os géis foram corados em solução de Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich) por 30min e descorados, até a obtenção do melhor contraste para visualização das bandas formadas, em solução aquosa de 40% Metanol (Merck) e 10% ácido acético (Merck) (Leber e Balkwill, 1997; Troeberg e Nagase, 2003) . A atividade gelatinolítica foi visualizada através da formação de bandas não coradas com Cooomassie, indicando a degradação da gelatina nessa porção do gel. A intensidade de cada banda foi quantificada por densitometria, utilizando-se o programa computacional ImageJ (NIH), e normalizadas pelo número de células. Para cada uma das condições estudadas, foram realizados três experimentos independentes.

3.17. Western Blot

3.17.1. Obtenção de extratos protéicos totais

As linhagens celulares submetidas às diferentes condições de tratamento foram lavadas duas vezes com PBSA gelado, coletadas com o auxílio de um “policial” e centrifugadas a 2.400g por 5min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido em 1mL de PBSA gelado, sendo novamente centrifugadas, agora a 20.800g por 1min. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspendido em 500µL de solução de lise (50mM Tris HCl pH 7,5; 5mM EDTA pH 8,0;

300mM NaCl e 1% NP-40) acrescido de inibidores de proteases específicos (GE HeathCare, Little Chalfont, Reino Unido). A seguir, o lisado foi passado de 5 a 10 vezes em seringa com agulha de 22G, para quebrar do DNA. Posteriormente, o material foi mantido no gelo por 10min e centrifugado a 20.800g por 30min, para clarificação do sobrenadante por meio da retirada dos “debris” celulares.

3.17.2. Fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose

A concentração das proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (Kit Bio Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando-se uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina). As amostras quantificadas foram submetidas ao fracionamento em gel vertical contendo de 8 à 14% poliacrilamida – SDS, à uma voltagem constante de 50 a 100V, durante 3 a 4 horas. Em seguida, as amostras fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por transferência úmida (300mA por 2h) em tampão de transferência (0,3% de Tris; 1,44% de glicina; 0,1% de SDS e 20% metanol).

3.17.3. Imunoreação

Para inibição da marcação de sítios inespecíficos, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado em tampão TBST (50mM TrisCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20), por 16h, à 4ºC. Posteriormente, a membrana foi submetida a três lavagens com TBST, à temperatura ambiente, por 10min. A incubação com o anticorpo primário de interesse, diluído

adequadamente em TBST 5% leite, foi realizada à temperatura ambiente ou 4°C, por 2h ou 16h, dependendo do anticorpo. A membrana foi lavada três vezes com TBST, à temperatura ambiente por 10min, e, em seguida, esta foi incubada com o anticorpo secundário, anti-IgG conjugado com peroxidase (diluído em TBST 5% leite) à temperatura ambiente por 1h. A membrana foi novamente lavada três vezes com TBST, à temperatura ambiente por 10min, e a marcação foi obtida utilizando-se o Kit ECL™ para detecção de proteínas por quimioluminescência, seguindo-se as recomendações do fabricante (GE HealthCare).. As imagens das bandas foram quantificadas por densitometria, por meio da utilização do programa computacional ImageQuant 5.2 (GE HealthCare).

3.18. Indução da diferenciação osteogênica e adipogênica

Células HU-2, HU-4 e HU-5 foram submetidas a diferenciação osteogênica e adipogênica pela Dra Maria Fernanda Forni. Cerca de 1.10^5 células foram semeadas em placas de 35 mm. Quando as culturas atingiram aproximadamente 90-100% de confluência o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para a diferenciação osteogênica (αMEM, 10% SFB, 100nM dexametasona, 50µg/ml ácido ascórbico, 10 mM β-glicerofosfato) ou adipogênica (αMEM, 10% SFB, 1µM dexametasona, 0,5 mM isobutilmetilxantina, 100mM indometacina e 10 µg/ml insulina). As células destes grupos foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 por 7, 14 e 21 dias, sendo o meio trocado duas vezes por semana (Forni, 2013).

3.19. Análise estatística

Para variáveis quantitativas, utilizou-se teste t de Student quando foram analisadas apenas duas populações de dados. Para as comparações múltiplas, foram realizadas análise de variância ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tuckey-Kramer. Por sua vez o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste *a posteriori* de Dunn's, foi utilizado para o tratamento de amostras com magnitudes de expressão muito dispares e não enquadradas ao perfil distribuição normal. Testes de correlação de Spearman foram aplicados nas análises de correlação.

Em relação às amostras de pacientes, amostras com magnitudes de expressão muito dispares e não enquadradas ao perfil distribuição normal, a comparação dos níveis de expressão relativa de mRNA entre os diferentes graus de astrocitoma foi realizada através de uma análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) seguida do teste *post hoc* Dunn. O teste de Spearman foi utilizado para análise de correlação entre a expressão dos transcritos analisados. Para análise de sobrevida utilizou-se o método de Kaplan-Meier e o teste estatístico de Mantel-Cox. Para comparação entre os subgrupos de amostras de GBM, o teste de Mann-Whitney foi utilizado.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS (Microsoft, CA, EUA) ou GraphPad Prism 4 (GraphPad, CA, EUA). Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

4. Resultados

4.1. Identificação e caracterização das variantes de *splicing* alternativo do gene supressor de tumor RECK

4.1.1. Análise de etiquetas de sequências expressas *(ESTs - Expressed Sequence Tags)* e sequências de RNA não-referência para identificação de variantes de *splicing* de *RECK*

O gene supressor de tumor *RECK* humano abrange uma região de 87 kbp na região cromossômica 9p13.3. Até o momento, *RECK* possui somente um transcrito descrito na literatura, o qual é constituído de 21 exons (Genbank Accession Number: NM_021111, Ensembl transcript ID: ENST00000377966) (Takahashi, Sheng *et al*., 1998).

Para investigar a possível ocorrência de eventos de *splicing* alternativo envolvendo *RECK*, ESTs e sequências de mRNA não-referência que apresentam homologia em relação à sequência do gene *RECK* foram identificadas e analisadas através da ferramenta BLAT (Ishii, Maier *et al*., 1999)(Kent, 2002), em busca de candidatos a variantes ou fragmentos de variantes de *splicing* de *RECK*.

A partir das ESTs analisadas e sequências de mRNA não referência, foi possível identificar sete sequências que seriam candidatas a transcritos gerados por *splicing* alternativo de *RECK*, a saber: BC050306, que possui uma inserção de um exon alternativo entre os exons dois e três do transcrito canônico; CR593801, BU599106, e BC032240, que possuem um nono exon alternativo e final; BX648668, que possui o primeiro exon alternativo e homólogo ao exon quatro do transcrito canônico; BP230250, que apresenta uma deleção dos exons quatro a seis do transcrito canônico; AL701650, que possui o primeiro exon alternativo e homólogo

ao exon sete do transcrito canônico; e BX648668, que apresenta uma inserção entre os exons 14 e 15 do transcrito canônico. Após essa varredura inicial, a análise posterior foi focada nos candidatos a variantes de *splicing* originados por processamento alternativo envolvendo a junção exon 8/ exon 9, uma vez que, na época, duas sequências de mRNA não-referência indicando alterações nessa região foram encontradas. Assim, selecionaram-se as ESTs que indicavam a presença de um 9º exon alternativo, sendo eles: Genbank CR593801, isolado de Neuroblastoma humano, submetido em 20 de julho de 2004 e removido, a pedido do pesquisador que o submeteu (Li *et al*., não publicado, Life Technologies); BC032240; e BU599106 (Figura 4.1.1.). As sequências correspondentes às ESTs CR593801 e BC032240 são homólogas às sequências não-referência: CR593801.1, submetido em 20 de julho de 2004 e removido a pedido do pesquisador que o submeteu (Li *et al*., não publicado, Life Technologies); e BC060806.1 (Strausberg, Feingold *et al*., 2002), respectivamente (Figura 4.1.1.).

As variantes alternativas de *RECK* foram denominadas: *RECK-B* (homóloga à sequência não-referência de mRNA Genbank CR593801.1), *RECK-D* (homóloga à sequência não-referência de mRNA Genbank BC060806.1) (Strausberg, Feingold *et al*., 2002), e *RECK-I* (homóloga à EST Genbank BU599106).

Figura 4.1.1.: Sequências nucleotídicas homólogas ao gene *RECK*. ESTs, na porção inferior da figura, e sequências não-referência de mRNA, em roxo claro, utilizadas na busca de variantes de *RECK* geradas por *splicing* alternativo. As sequências selecionadas para análise BC060806.1 e BU599106 estão destacadas com uma seta vermelha. Resultados obtidos através da ferramenta BLAT em 01.02.2014 utilizando-se o banco Human Genome Assembly - GRCh37/hg19. Na porção superior da figura está representado o cromossomo nove com a região onde está localizado RECK em vermelho, exons são representados por caixas preenchidas e introns por linhas, as setas presentas nas linhas se referem ao sentido 5'-3' dos transcritos.

4.1.2. Amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento das variantes de *Splicing* de *RECK*

De forma a confirmar a existência e a caracterizar as estruturas dos transcritos alternativos de *RECK*, foram perseguidas duas abordagens diferentes. Quanto às isoformas *RECK-B* e *RECK-D,* que já apresentavam suas sequências nucleotídicas integralmente depositadas no GenBank, pares de *primers* foram desenhados para amplificar a região do quadro aberto de leitura das variantes por PCR convencional (Figura 4.1.2.1). No caso da isoforma *RECK-I*, além da amplificação do quadro aberto de leitura previsto por RT-PCR convencional, desenharam-se *primers* para a amplificação de suas regiões 3´-UTR e 5´-UTR por RACE (descritos nas sessões 3.6.1. e 3.8.) em dois modelos diferentes. Para a realização das RT-PCRs utilizou-se, como substrato, o RNA total de células de melanoma humano 1205Lu e astrocitoma grau III U373 MG. Porém, como a identidade das células U373 MG distribuídas pela ATCC foi questionada (Ishii, Maier *et al*., 1999), deu-se continuidade à análise com o produto de PCR obtido a partir do RNA de células 1205Lu . Pode-se observar que a variante *RECK-D* apresenta duas bandas no gel de resolução dos produtos de RT-PCR convencional (Figura 4.1.2.1).

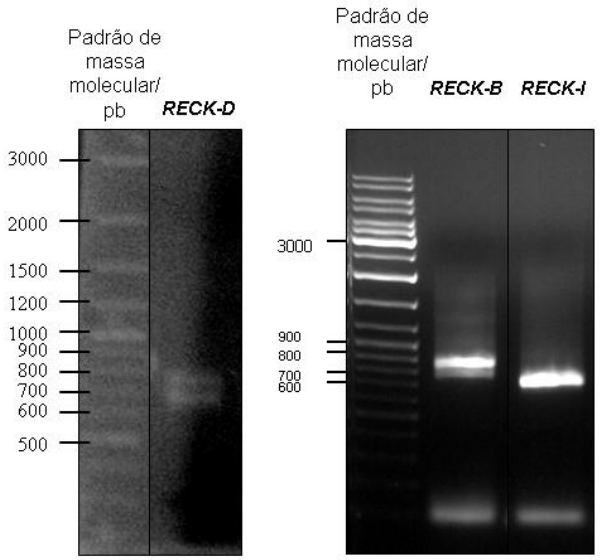


Figura 4.1.2.1.: Análise por eletroforese em gel de agarose das reações de RT-PCR realizadas para a obtenção da região do quadro aberto de leitura dos transcritos alternativos de *RECK (RECK-D, RECK-B e RECK-I)*. Os tamanhos esperados dos fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação por RT-PCR da região do quadro aberto de leitura dos transcritos RECK-D, RECK-B e RECK-I são 765 pb, 750 pb e 700 pb, respectivamente. Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1,2%.

Os produtos de PCR obtidos foram então clonados no vetor pGEM T–Easy (conforme descrito nas sessões 3.6), selecionando-se cinco clones bacterianos de cada construção para sequenciamento. As sequências obtidas referentes a cada transcrito de *RECK* estão indicadas a seguir:

RECK-B (765nt):

ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGGGTC
GCGGAGGTGGCAGGGGGCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTTGTAATCATTCAAAG
GATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAATCCCGACTAAAA
CATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATTGCCCAGAGACAATGGTTGAAATTTGGAATTGTATGAA
TTCATCTTTGCCAGGTGTGTTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTTGGCTTAGGCTGCTGTGAACTGG
CTATTGCCTTGGAGTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTT
TGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGTTGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGT
TGCAGTTATGCAGGTCATCACACAAACTGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTC
TTCTCCTGGTCCATCTCAGATAAAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAAT
ACATTGTGTGAACAATTATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATA**G**GCCTCCTGATGA

AGCTGCACCTGAAATGGCTCTTCAGAGTCTCCGCTTTGTACATCCTGGAATCCATTTTCTTCACCT
AGAGGTGACCAGATTTATAAAAACTGACTGATTGACCAAACTGACCAAA

RECK-D (750nt):

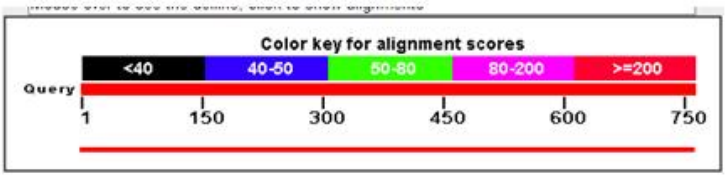
ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGGGTC
GCGGAGGTGGCAGGGGGCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTTGTAATCATTCAAAG
GATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAATCCCGACTAAAA
CATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATTGCCCAGAGACAATGGTTGAAATTTGGAATTGTATGAA
TTCATCTTTGCCAGGTGTGTTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTTGGCTTAGGCTGCTGTGAACTGG
CTATTGCCTTGGAGTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTT
TGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGTTGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGT
TGCAGTTATGCAGGTCATCACACAAACTGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTC
TTCTCCTGGTCCATCTCAGATAAAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAAT
ACATTGTGTGAACAATTATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATATGTTTGAATTTTTT
GCCAATGAGCAATTATTACTTTTGTAATTAAAAAGTCATAACAATGAGAAGAGAGCCTGATATCTTT
TAAAAATTAGGGCCTCCTGATGAAGCTGCACC

RECK-I (700nt):

ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGGGTC
GCGGAGGTGGCAGGGGGCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTTGTAATCATTCAAAG
GATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAATCCCGACTAAAA
CATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATTGCCCAGAGACAATGGTTGAAATTTGGAATTGTATGAA
TTCATCTTTGCCAGGTGTGTTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTTGGCTTAGGCTGCTGTGAACTGG
CTATTGCCTTGGAGTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTT
TGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGTTGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGT
TGCAGTTATGCAGGTCATCACACAAACTGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTC
TTCTCCTGGTCCATCTCAGATAAAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAAT
ACATTGTGTGAACAATTATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATAGCAGATCTGTGCT
CTCTGACATTTAGTCTATACGAGATACTGCTGGAGCTAAGGAGATGGCAG

Para confirmar a identidade das sequências amplificadas, as mesmas foram alinhadas às sequências das ESTs e mRNAs não-referência correspondentes através da ferramenta BLAST (Altschul, Gish *et al.,* 1990). Assim, a sequência referente à amplificação de *RECK-B* foi alinhada à sequência Genbank CR593801.1 (Figura 4.1.2.2), *RECK-D* (Figura 4.1.2.3) à Genbank BC060806.1 (Strausberg, Feingold *et al*., 2002), e *RECK-I* à EST Genbank BU599106 (Figura 4.1.2.4). Os resultados obtidos confirmam a existência e identidade de três transcritos gerados por *splicing* alternativo de RECK, ou seja: *RECK-B*, *RECK-D* e *RECK-I*. A sequência parcial obtida, correspondente à região do quadro aberto de leitura de *RECK-I*, é

inédita, tendo sido submetida ao Genbank (GenBank JQ756320.1), como resultado deste trabalho.



Alignments Download Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
None provided	1413	1413	100%	0.0	100%	57737

Sequence ID: lcl|57737 Length: 1579 Number of Matches: 1

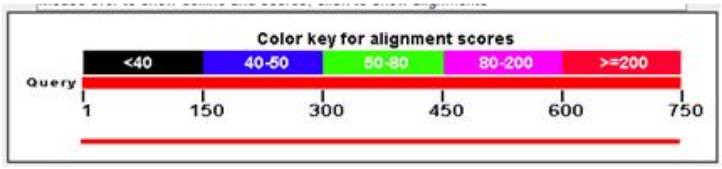
Range 1: 74 to 838 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous M

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1413 bits(765)	0.0	765/765(100%)	0/765(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  74   ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGG  133

Query  61   GTCGCGGAGGTGGCAGGGGGCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTTGTAATCAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  134  GTCGCGGAGGTGGCAGGGGGCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTTGTAATCAT  193

Query  121  TCAAAGGATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  194  TCAAAGGATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAA  253

Query  181  TCCCGACTAAAACATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATTGCCCAGAGACAATGGTTGAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  254  TCCCGACTAAAACATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATTGCCCAGAGACAATGGTTGAA  313

Query  241  ATTTGGAATTGTATGAATTCATCTTTGCCAGGTGTGTTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  314  ATTTGGAATTGTATGAATTCATCTTTGCCAGGTGTGTTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTT  373

Query  301  GGCTTAGGCTGCTGTGAACTGGCTATTGCCTTGGAGTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  374  GGCTTAGGCTGCTGTGAACTGGCTATTGCCTTGGAGTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCA  433

Query  361  TCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  434  TCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGT  493

Query  421  TGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTTGCAGTTATGCAGGTCATCACACAAAC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  494  TGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTTGCAGTTATGCAGGTCATCACACAAAC  553

Query  481  TGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  554  TGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATA  613

Query  541  AAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAATACATTGTGTGAACAAT  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  614  AAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAATACATTGTGTGAACAAT  673

Query  601  TATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATAGGCCTCCTGATGAAGCTGCACCT  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  674  TATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATAGGCCTCCTGATGAAGCTGCACCT  733

Query  661  GAAATGGCTCTTCAGAGTCTCCGCTTTGTACATCCTGGAATCCATTTTCTTCACCTAGAG  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  734  GAAATGGCTCTTCAGAGTCTCCGCTTTGTACATCCTGGAATCCATTTTCTTCACCTAGAG  793

Query  721  GTGACCAGATTTATAAAAACTGACTGATTGACCAAACTGACCAAA  765
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  794  GTGACCAGATTTATAAAAACTGACTGATTGACCAAACTGACCAAA  838
```

Figura 4.1.2.2: Alinhamento confirmando a identidade de *RECK-B*. Alinhamento do resultado do sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR referente

ao quadro aberto de leitura de *RECK-B* (submetido como Query) e a sequência não-referencia Genbank CR593801.1 (submetida como Sbjct). Resultados obtidos através da ferramenta BLAST em 01.02.2014. No painel superior a coloração vermelha indica alinhamento com alta afinidade.



Alignments Download Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
None provided	1375	1375	100%	0.0	99%	34469

Sequence ID: lcl|34469 Length: 1723 Number of Matches: 1

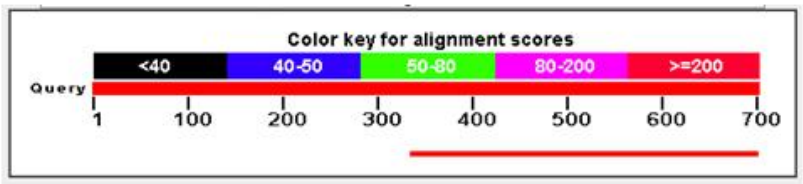
Range 1: 61 to 810 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1375 bits(744)	0.0	748/750(99%)	0/750(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCTCCTTCTGCTGGCCGTGGCGGGG  60
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||| |||||
Sbjct  61   ATGGCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCGCTGCCCCTTCTGCTGGCCGTGACGGGG  120

Query  61   GTCGCGGAGGTGGCAGGGGGCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTTGTAATCAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GTCGCGGAGGTGGCAGGGGGCCTGGCTCCGGGCAGTGCGGGTGCATTGTGTTGTAATCAT  180

Query  121  TCAAAGGATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TCAAAGGATAACCAAATGTGCCGTGATGTATGTGAACAGATTTTCTCCTCAAAAAGTGAA  240

Query  181  TCCCGACTAAAACATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATTGCCCAGAGACAATGGTTGAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TCCCGACTAAAACATCTGTTGCAGCGAGCCCCAGATTATTGCCCAGAGACAATGGTTGAA  300

Query  241  ATTTGGAATTGTATGAATTCATCTTTGCCAGGTGTGTTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  ATTTGGAATTGTATGAATTCATCTTTGCCAGGTGTGTTTAAGAAGTCTGATGGCTGGGTT  360

Query  301  GGCTTAGGCTGCTGTGAACTGGCTATTGCCTTGGAGTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GGCTTAGGCTGCTGTGAACTGGCTATTGCCTTGGAGTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCA  420

Query  361  TCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  TCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAAAGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGT  480

Query  421  TGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTTGCAGTTATGCAGGTCATCACACAAAC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  TGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTTGCAGTTATGCAGGTCATCACACAAAC  540

Query  481  TGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  TGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGACTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATA  600

Query  541  AAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAATACATTGTGTGAACAAT  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601  AAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCCACAATTAATACATTGTGTGAACAAT  660

Query  601  TATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATATGTTTGAATTTTTTGCCAATGAG  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661  TATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGATATGTTTGAATTTTTTGCCAATGAG  720

Query  661  CAATTATTACTTTTGTAATTAAAAAGTCATAACAATGAGAAGAGAGCCTGATATCTTTTA  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721  CAATTATTACTTTTGTAATTAAAAAGTCATAACAATGAGAAGAGAGCCTGATATCTTTTA  780

Query  721  AAAATTAGGGCCTCCTGATGAAGCTGCACC  750
            |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781  AAAATTAGGGCCTCCTGATGAAGCTGCACC  810
```

Figura 4.1.2.3: Alinhamento confirmando a identidade de *RECK-D*. Alinhamento do resultado do sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR referente

ao quadro aberto de leitura de *RECK-D* (submetido como Query) e a sequência não-referência do Genbank BC060806.1 (submetida como Sbjct). Resultados obtidos através da ferramenta BLAST em 01.02.2014. No painel superior a coloração vermelha indica alinhamento com alta afinidade.



Alignments Download Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
None provided	675	675	52%	0.0	100%	11831

Range 1: 2 to 366 Graphics Next Match Previou

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
675 bits(365)	0.0	365/365(100%)	0/365(0%)	Plus/Plus

```
Query  336  GTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAA  395
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2    GTGTCGACAGGCATGCAAGCAGGCATCTTCAAAGAATGATATTTCCAAAGTTTGCAGAAA  61

Query  396  AGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGTTGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTTG  455
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  62   AGAATATGAGAATGCTCTTTTCAGTTGCATTAGCAGAAATGAAATGGGCTCGGTTTGTTG  121

Query  456  CAGTTATGCAGGTCATCACACAAACTGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGA  515
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  122  CAGTTATGCAGGTCATCACACAAACTGCCGAGAATACTGTCAAGCCATTTTTCGAACAGA  181

Query  516  CTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATAAAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCC  575
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  182  CTCTTCTCCTGGTCCATCTCAGATAAAAGCAGTGGAAAATTATTGCGCCTCTATTAGTCC  241

Query  576  ACAATTAATACATTGTGTGAACAATTATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGA  635
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  242  ACAATTAATACATTGTGTGAACAATTATACTCAATCTTATCCAATGAGGAACCCAACGGA  301

Query  636  TAGCAGATCTGTGCTCTCTGACATTTAGTCTATACGAGATACTGCTGGAGCTAAGGAGAT  695
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  302  TAGCAGATCTGTGCTCTCTGACATTTAGTCTATACGAGATACTGCTGGAGCTAAGGAGAT  361

Query  696  GGCAG  700
            |||||
Sbjct  362  GGCAG  366
```

Figura 4.1.2.4: Alinhamento confirmando a identidade de *RECK-I*. Alinhamento do resultado do sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR referente ao quadro aberto de leitura de *RECK-I* (submetido como Query) e a sequência da EST Genbank BU599106 (submetida como Sbjct). Resultados obtidos através da ferramenta BLAST em 01.02.2014. No painel superior a coloração vermelha indica alinhamento com alta afinidade.

A amplificação das regiões 5´e 3´-UTR de *RECK-I*, através de RACE, está em andamento visando submissão da sequência do transcrito completo ao Genbank.

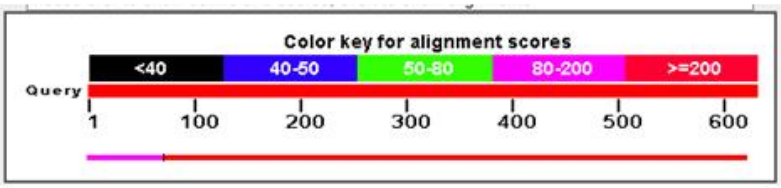
Além disso, essa estratégia também está sendo perseguida para os transcritos *RECK-B* e *–D* para confirmação das sequências, e no caso de *RECK-B*, cuja sequência foi removida do GenBank, também para sua re-submissão.

Sequenciou-se, também, o subproduto da RT-PCR referente a *RECK-D*, que pode ser visualizado no gel de resolução dos produtos de PCR (Figura 4.2.1.1) como uma banda entre 600 e 700 nt.

Sequência do subproduto de amplificação por RT-PCR utilizando-se os primers para amplificação de *RECK-D* (628 nt):

AGGTGCAGCTTCATCAGGAGGCCTATCCGTTGGGTTCCTCATTGGATAAGATTGAGTATAATTGT
TCACACACTGCTTTTATCTGAGATGGACCAGGAGAAGAGTCTGTTCGAAAAATGGCTTGACAGTA
TTCTCGGCAGTTTGTGTGATGACCTGCATAACTGCAACAAACCGAGCCCATTTCATTTCTGCTAAT
GCAACTGAAAAGAGCATTCTCATATTCTTTTCTGCAAACTTTGGAAATATCATTCTTTGAAGATGCC
TGCTTGCATGCCTGTCGACACTCCAAGGCAATAGCCAGTTCACAGCAGCCTAAGCCAACCCAGC
CATCAGACTTCTTAAACACACCTGGCAAAGATGAATTCATACAATTCCAAATTTCAACCATTGTCTC
TGGGCAATAATCTGGGGCTCGCTGCAACAGATGTTTTAGTCGGGATTCACTTTTTGAGGAGAAAA
TCTGTTCACATACATCACGGCACATTTGGTTATCCTTTGAATGATTACAACACAATGCACCCGCAC
TGCCCGGAGCCAGGCCCCCTGCCACCTCCGCGACCCCCGCCACGGCCAGCAGAAGGAGCAGC
GCACCTCGCAGAGAGGCCCGGACGGTCGCCATTCTAGAGGG

O subproduto obtido apresenta maior homologia à sequência do transcrito *RECK-B*, com uma aparente deleção entre os nucleotídeos 622 e 662 (Figura 4.1.2.5.), porém, uma análise posterior para verificação se este subproduto refletiria um quarto transcrito alternativo não foi perseguida. A amplificação de uma sequência homóloga a *RECK-B,* pelos *primers* desenhados para amplificação de *RECK-D,* não é surpresa pois, como será analisado em 4.1.3 e esquematizado na Figura 4.1.3.1, os sítios aceptores alternativos de *splicing* referentes à seleção do nono exon dos transcritos RECK-B e RECK-D estão muito próximos, sendo o sítio aceptor de *splicing* de *RECK-D* localizado mais a 3´.



Alignments Download Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
None provided	1014	1149	98%	0.0	100%	5111

Sequence ID: lcl|5111 Length: 1579 Number of Matches: 2

Range 1: 74 to 622 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1014 bits(549)	0.0	549/549(100%)	0/549(0%)	Plus/Minus

```
Query  71   CACTGCTTTTATCTGAGATGGACCAGGAGAAGAGTCTGTTCGAAAAATGGCTTGACAGTA  130
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  622  CACTGCTTTTATCTGAGATGGACCAGGAGAAGAGTCTGTTCGAAAAATGGCTTGACAGTA  563

Query  131  TTCTCGGCAGTTTGTGTGATGACCTGCATAACTGCAACAAACCGAGCCCATTTCATTTCT  190
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  562  TTCTCGGCAGTTTGTGTGATGACCTGCATAACTGCAACAAACCGAGCCCATTTCATTTCT  503

Query  191  GCTAATGCAACTGAAAAGAGCATTCTCATATTCTTTTCTGCAAACTTTGGAAATATCATT  250
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  502  GCTAATGCAACTGAAAAGAGCATTCTCATATTCTTTTCTGCAAACTTTGGAAATATCATT  443

Query  251  CTTTGAAGATGCCTGCTTGCATGCCTGTCGACACTCCAAGGCAATAGCCAGTTCACAGCA  310
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  442  CTTTGAAGATGCCTGCTTGCATGCCTGTCGACACTCCAAGGCAATAGCCAGTTCACAGCA  383

Query  311  GCCTAAGCCAACCCAGCCATCAGACTTCTTAAACACACCTGGCAAAGATGAATTCATACA  370
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  382  GCCTAAGCCAACCCAGCCATCAGACTTCTTAAACACACCTGGCAAAGATGAATTCATACA  323

Query  371  ATTCCAAATTTCAACCATTGTCTCTGGGCAATAATCTGGGGCTCGCTGCAACAGATGTTT  430
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  322  ATTCCAAATTTCAACCATTGTCTCTGGGCAATAATCTGGGGCTCGCTGCAACAGATGTTT  263

Query  431  TAGTCGGGATTCACTTTTTGAGGAGAAAATCTGTTCACATACATCACGGCACATTTGGTT  490
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  262  TAGTCGGGATTCACTTTTTGAGGAGAAAATCTGTTCACATACATCACGGCACATTTGGTT  203

Query  491  ATCCTTTGAATGATTACAACACAATGCACCCGCACTGCCCGGAGCCAGGCCCCCTGCCAC  550
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  202  ATCCTTTGAATGATTACAACACAATGCACCCGCACTGCCCGGAGCCAGGCCCCCTGCCAC  143

Query  551  CTCCGCGACCCCCGCCACGGCCAGCAGAAGGAGCAGCGCACCTCGCAGAGAGGCCCGGAC  610
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  142  CTCCGCGACCCCCGCCACGGCCAGCAGAAGGAGCAGCGCACCTCGCAGAGAGGCCCGGAC  83

Query  611  GGTCGCCAT  619
            |||||||||
Sbjct  82   GGTCGCCAT  74
```

Range 2: 662 to 733 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
134 bits(72)	4e-35	72/72(100%)	0/72(0%)	Plus/Minus

```
Query  1    AGGTGCAGCTTCATCAGGAGGCCTATCCGTTGGGTTCCTCATTGGATAAGATTGAGTATA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  733  AGGTGCAGCTTCATCAGGAGGCCTATCCGTTGGGTTCCTCATTGGATAAGATTGAGTATA  674

Query  61   ATTGTTCACACA  72
            ||||||||||||
Sbjct  673  ATTGTTCACACA  662
```

Figura 4.1.2.5: Alinhamento do subproduto de amplificação de *RECK-D* com *RECK-B*. Resultado do sequenciamento do subproduto de amplificação por RT-PCR referente ao quadro aberto de leitura de *RECK-D* (submetido como Query) e a sequência não-referência Genbank CR593801.1 (submetida como Sbjct). Resultados obtidos através da ferramenta BLAST em 01.02.2014. No painel superior a coloração vermelha indica alinhamento com alta afinidade.

4.1.3. Análise da sequência nucleotídica das variantes de *Splicing* de *RECK*

Analisando a sequência nucleotídica dos transcritos de *RECK*, pode-se concluir que as três variantes identificadas consistem de nove exons, compartilhando os oito primeiros exons com o transcrito canônico, enquanto o nono exon é final e diferente do nono exon do transcrito canônico e também único para cada variante de *splicing* avaliada. Estes transcritos são gerados através do reconhecimento de sítios aceptores de *splicing* alternativos na fronteira 3' – intron/ exon 9. O nono exon de cada variante descrita, assim como as fronteiras exon 8 – intron – exon 9 para cada variante estão representados na Figura 4.1.3. Pode-se observar que as sequências nucleotíticas das fronteiras exon/intron/exon entre os exons 8 e 9 de cada um dos transcritos possuem alguns desvios das sequências consenso para sítios de *splicing*, (AAG|GU ou CAG|GU na fronteira 5'- exon/ intron e CAG|GU na fronteira 3' intron/ exon) (Mount, 1982)(Tabela 4.1.3.).

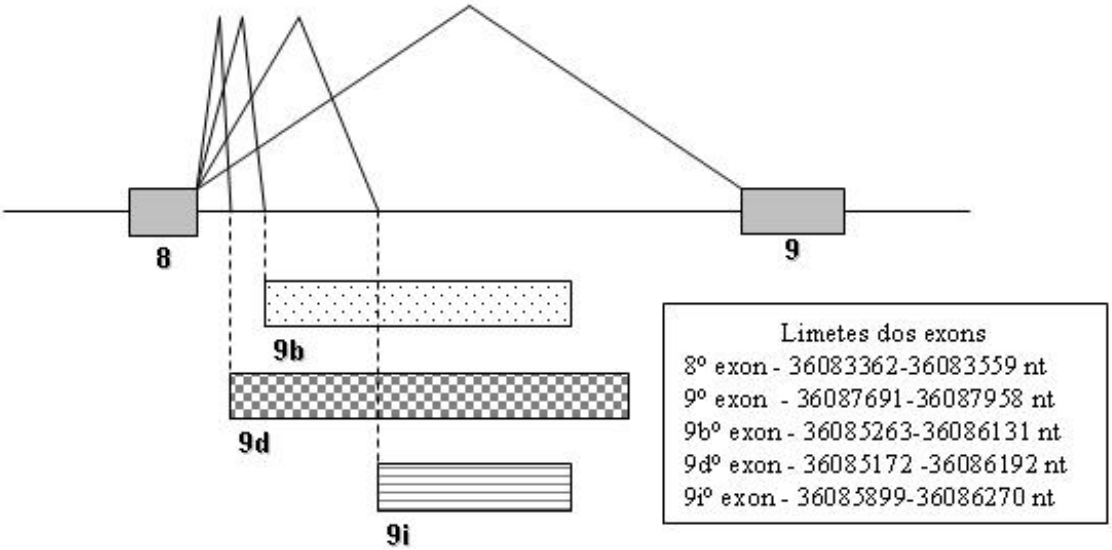


Figura 4.1.3: Representação das variantes de splicing alternativo de *RECK* focando na região dos exons oito e nove. O oitavo exon é compartilhado pelos quatro transcritos de *RECK*; o nono exon, por outro lado, é único para cada variante,

sendo gerado através do reconhecimento de sítios aceptores de *splicing* alternativos. Os exons estão representados por caixas preenchidas e os introns por linhas simples. 9 representa o nono exon do transcrito canônico de *RECK*; 9b representa o nono exon da variante *RECK-B*; 9d representa o nono exon da variante *RECK-D*; e 9i representa o nono exon da variante *RECK-I*. Os valores de limite dos exons nos nucleotídeos correspondentes no gene RECK estão especificados baseando-se nos dados disponíveis no GenBank.

Variante	*Exon doador (nt)*	*Exon aceptor (nt)*	*Tamanho do intron/kbp*	EXON/intron/EXON (*sequência consenso*: **AG|gu**ragu...**(y)**$_{10\text{-}15}$ny**ag|G**..)
RECK	8(197)	9(267)	4,132	GAUA|**gu**aagu...uuauauucugaaaaugu**ag|G**UUUA
RECK-B	8(197)	9(868)	1,704	GAUA|**gu**aagu...gauaucuuuuaaaaauu**ag|G**GCCU
RECK-D	8(197)	9(1020)	1,613	GAUA|**gu**aagu...accuucauuuguuuuaa**ag|G**CAGA
RECK-I	8(197)	9(371)	2,34	GAUA|**gu**aagu...cuuuauauauuuuccac**ag|**UGUUU

Tabela 4.1.3: Fronteiras dos sítios de *splicing* dos transcritos alternativos de RECK. Exons doadores e aceptores estão listados com seu tamanho em nucleotídeos (nt) expresso entre parênteses. A sequência consenso nos sítios de splicing 5´e 3´estão indicados por letras em negrito. Os sítios de splicing estão indicados por linhas verticais. y representa a região rica em pirimidinas, n qualquer nucleotídeo (Mount, 1982).

A sequência do gene *RECK* foi submetida à análise bioinformática utilizando-se as ferramentas de predição de *splicing* HSF (*Human Splice Finder*) e ExonScan (Desmet, Hamroun *et al.,* 2009) (Yeo e Burge, 2004) (Wang, Rolish *et al.,* 2004) (Fairbrother, Yeh *et al.,* 2002). Surpreendentemente, somente a variante *RECK-I* apresentou seu sítio aceptor de *splicing* predito pela ferramenta HSF, com um *MaxEnt matrice 3'- score* de 8,47, e nenhum dos sítios aceptores alternativos foram preditos pela ferramenta ExonScan, sugerindo que os três transcritos alternativos de *RECK* apresentam sítios aceptores de *splicing* aparentemente fracos.

4.1.4. Análise da sequência polipeptídica predita para as isoformas de RECK e confirmação de sua expressão

A sequência nucleotídica das três variantes de *RECK* foram submetidas à análise de seus potenciais de tradução através da ferramenta ORF Finder (*Open Reading Frame Finder*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EUA). Todos os transcritos apresentam potencial para codificar proteínas. As três isoformas protéicas descritas compartilham o códon iniciador ATG com a variante canônica, na qual o quadro aberto de leitura se inicia no primeiro exon, compartilham sua sequencia primária até o 213º aminoácido, porém cada isoforma alternativa possui uma sequencia C-terminal e um códon de parada de tradução exclusivo, devido à seu nono exon. Abaixo estão representadas as sequências polipeptídicas das isoformas RECK-B, RECK-D e RECK-I. Os resíduos de aminoácido grifados e em negrito delimitam a sequência polipeptídica exclusiva para cada isoforma.

RECK- B (248aa):

M A T V R A S L R G A L L L LL A V A G V A E V A G G L A P G S A G A L C
C N H S K D N Q M C R D V C E Q I F S S K S E S R L K H L L Q R A P D Y C
P E T M V E I W N C M N S S L P G V F K K S D G W V G L G C C E L A I A L
E C R Q A C K Q A S S K N D I S K V C R K E Y E N A L F S C I S R N E M G
S V C C S Y A G H H T N C R E Y C Q A I F R T D S S P G P S Q I K A V E N
Y C A S I S P Q L I H C V N N Y T Q S Y P M R N P T D **R** P P D E A A P E M
A L Q S L R F V H P G I H F L H L E V T R F I K T D

RECK-D (225aa, GenBank Accession Number: AAH60806.1):

M A T V R A S L R G A L L L L L A V A G V A E V A G G L A P G S A G A L
C C N H S K D N Q M C R D V C E Q I F S S K S E S R L K H L L Q R A P D Y
C P E T M V E I W N C M N S S L P G V F K K S D G W V G L G C C E L A I A
L E C R Q A C K Q A S S K N D I S K V C R K E Y E N A L F S C I S R N E M
G S V C C S Y A G H H T N C R E Y C Q A I F R T D S S P G P S Q I K A V E
N Y C A S I S P Q L I H C V N N Y T Q S Y P M R N P T D **M** F E F F A N E Q
L L L L

RECK-I (220aa):

M A T V R A S L R G A L L L LL A V A G V A E V A G G L A P G S A G A L C
C N H S K D N Q M C R D V C E Q I F S S K S E S R L K H L L Q R A P D Y C
P E T M V E I W N C M N S S L P G V F K K S D G W V G L G C C E L A I A L
E C R Q A C K Q A S S K N D I S K V C R K E Y E N A L F S C I S R N E M G
S V C C S Y A G H H T N C R E Y C Q A I F R T D S S P G P S Q I K A V E N
Y C A S I S P Q L I H C V N N Y T Q S Y P M R N P T D **S** R S V L S D I

A figura 4.1.4.1 representa de forma esquemática a estrutura de domínios das isoformas RECK-B, RECK-D e RECK-I frente à encontrada na isoforma canônica de RECK.

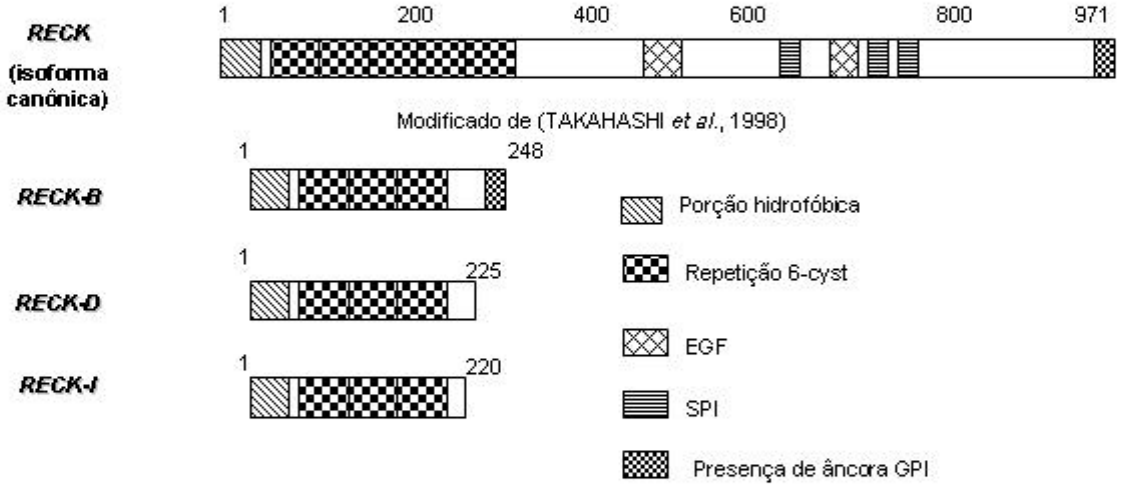


Figura 4.1.4.1.: Representação esquemática das isoformas protéicas de RECK. O número de resíduos de aminoácidos está indicado na região superior de cada proteína. Os diferentes domínios estão representados por caixas com diferentes preenchimentos. A análise foi gerada utilizando-se as ferramentas PROSITE e GPISOM.

De acordo com a previsão, as variantes alternativas de RECK codificam proteínas menores que a variante canônica, a qual possui 971 animo ácidos. A sequência da proteína RECK-D, com 225 aminoácidos, já havia sido identificada em placenta humana e depositada (GenBank AAH60806) (Strausberg, Feingold *et al*., 2002). A sequência polipeptídica de RECK-B predita possui 248 aminoácidos, e a da

RECK-I, 220 aminoácidos. As três proteínas compartilham seus primeiros 213 aminoácidos em seu N-terminal com a proteína canônica e entre si, mas apresentam sequências C-terminais distintas (Figura 4.1.4.1.). Análise das sequências de aminoácidos de RECK-B, RECK-D e RECK-I, através das ferramentas PROSITE e GPISOM, mostra que as isoformas alternativas de RECK apresentam parte do domínio de repetições de cisteína presente na isoforma canônica, porém, não contêm domínios do tipo EGF e SPI como a RECK canônica. As três isoformas possuem sítios potenciais de N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr) na região comum entre elas (aminoácidos 39-42, 86-89 e 200-203). Além disso, RECK-B tem potencial para ser ancorado à membrana por uma cauda GPI, assim como RECK canônico, sugerindo uma possível colocalização celular (Figura 4.1.4.1.).

De modo a detectar a expressão destas proteínas, as regiões codificadoras das isoformas alternativas de RECK fusionadas a uma cauda de oito histidinas foram clonadas no vetor TOPO cDNA3.3 (Sessão 3.7.2) e expressas em células 293S FreeStyle e 293T aderentes (Figura 4.1.4.2.). Optou-se pela estratégia de se expressar as isoformas alternativas de RECK fusionadas a uma cauda histidina devido a não haver anticorpos comerciais que detectem essas isoformas. RECK-D só foi expressa com sucesso em células 293-S, e não nas células 293T aderentes, ainda assim, sua expressão foi bem menor comparada às isoformas RECK-B e RECK-I apesar de se tratar do mesmo vetor de expressão.

As proteínas previstas teriam as seguintes massas: RECK-B, 27,2 kDa; RECK-D, 24,7 kDa; e RECK-I 24,2 kDa. As proteínas expressas apresentam as seguintes massas aproximadas: RECK-B: 40 kDa; correspondente à banda encontrada no meio condicionado das células superexpressando RECK-B, e 27 kDa, correspondente a banda encontrada no extrato celular das mesmas células; RECK-

D, 36kDa; e RECK-I, 37 kDa. A diferença observada entre as massas previstas e observadas é aproximadamente a mesma, ou seja: 12 kDa, podendo ser explicada pelo processamento pós-traducional das proteínas ou pela imprecisão inerente a esse tipo de estimativa. As três isoformas possuem três sítios de N-glicosilação em regiões das proteínas que são comuns às três variantes. É interessante notar que a proteína RECK-B foi também expressa no extrato celular, enquanto que RECK-I e RECK-D só foram detectadas no meio condicionado de células 293S e 293T. A proteína RECK-B detectada no extrato celular de células superexpressoras tem em torno de 27 kDa, muito próxima à massa predita, em contraste com a proteína presente no meio condicionado, que possui aproximadamente 40 kDa, reforçando a hipótese de processamento pós-traducional dessas proteínas, que ocorreria antes de sua liberação para o meio extracelular.

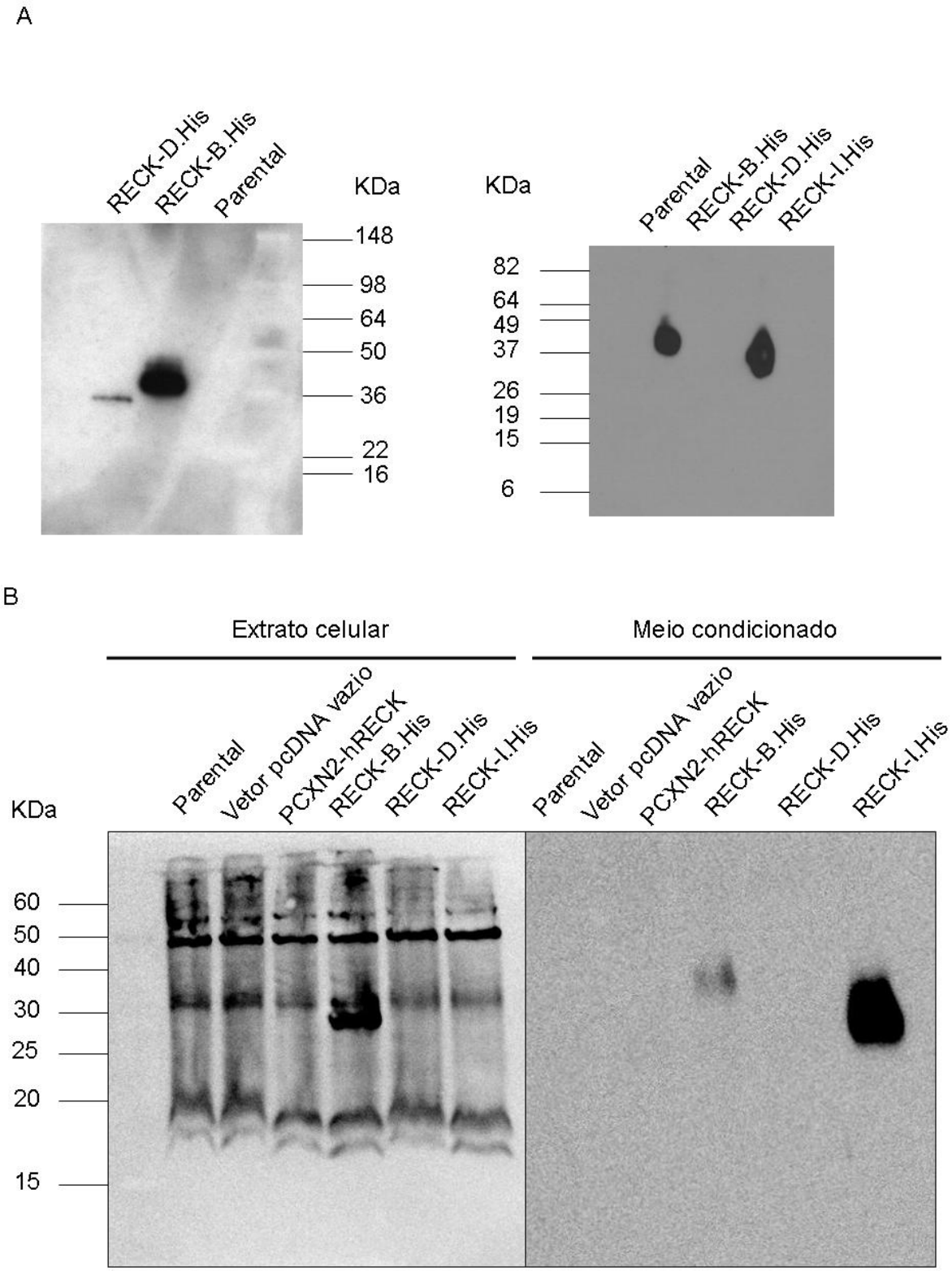


Figura 4.1.4.2: Expressão das isoformas alternativas de RECK. As sequências polipeptídicas das isoformas RECK-B, -D e –I estão fusionadas a uma cauda de oito histidinas e foram expressas em dois modelos diferentes: células 293S, cuja cultura se dá em suspensão e estão representados dois experimentos independentes, a transfecção foi realizada com 1.10^7 células (A); e células 293T, cultura aderente, cuja transfecção foi realizada com 1.10^6 células (B). e o meio condicionado foi coletado após 96 horas, concentrado 5x para o caso de 293S, e 25µL foram

aplicados no gel. O anticorpo anti-his foi utilizado na proporção de 1:3000 (H1029, Sigma). As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12%.

A tabela 4.1.4 apresenta um resumo dos dados coletados ou previstos referentes a cada transcrito alternativo de *RECK*, evidenciando que: as três variantes identificadas possuem nove exons cada uma, em contraste com os 21 exons da forma canônica; o tamanho dos transcritos, sendo que no caso de *RECK-I* apresenta-se uma estimativa levando-se em conta a porção da EST que não foi amplificada e sequenciada neste trabalho; o tamanho das proteínas preditas; e a possibilidade de ancoramento à membrana por GPI.

Variante	*Número de Exons*	*Exon que difere do transcrito canônico*	*Tamanho do Transcrito /bp*	*Proteína predita*	*Ancorado por GPI*
RECK canônica	21	--	4,414	971 aa	*Sim*
RECK-B	9	9º	1,548	248aa	*Sim*
RECK-D	9	9º	1,737	225aa	*Não*
RECK-I	9	9º	1,101	248aa	*Não*

Tabela 4.1.4: Resumo das características das variantes de *splicing* de *RECK*. O tamanho do transcrito *RECK-I* apresentado é uma estimativa levando-se em conta a porção da EST que não foi amplificada e sequenciada neste trabalho.

4.1.5. Perfil de expressão dos transcritos de *RECK* em painel de RNA de tecidos normais

Para analisar o padrão de expressão dos transcritos de *RECK*, seu perfil de expressão foi determinado em um painel de RNA de tecidos humanos normais (Human Total RNA Master Panel II/ Clontech) através de qRT-PCR (segundo

descrito na sessão 3.9). Para tanto, foram desenhados pares de *primers* para detectar cada transcrito de *RECK* individualmente (sessão 3.9.2 e Tabela 4). Cada par de *primers* tem, como alvo, a região que flanqueia a junção exon 8/ exon 9 dos transcritos de modo que amplificação é especifica para cada variante. O cDNA das amostras foi sintetizado como descrito na sessão 3.9.1.

Os resultados de qRT-PCR (Figura 4.1.5.1) representam os valores médios obtidos, em triplicata, correspondentes a duas sínteses de cDNA diferentes. Os dados de expressão gênica relativa foram calculados utilizando-se a glândula adrenal, escolhida aleatoriamente, como referência. Os níveis de expressão relativa, correspondentes aos genes *GAPDH e HPRT*, foram submetidos ao programa computacional GeNorm para o cálculo do Fator de Normalização (Vandesompele, De Preter *et al.,* 2002). Todos os resultados de expressão gênica relativa apresentados a seguir utilizam este Fator de Normalização como controle endógeno das reações de qRT-PCR.

Observa-se que todas as variantes alternativas de *RECK*, assim como seu transcrito canônico, apresentam um padrão de expressão similar em tecidos normais (Figura 4.1.5.1). Porém, observam-se padrões distintos quando da comparação dos níveis de expressão de cada variante em relação à expressão do transcrito canônico (Figura 4.1.5.2). É interessante notar que o balanço dos níveis de expressão entre *RECK-B/RECK* e *RECK-D/ RECK* apresentam uma diminuição em fígado fetal quando comparados ao fígado adulto. Por outro lado, a variante canônica é altamente expressa em tecido de cérebro adulto, quando comparada a suas variantes alternativas, porém, em cérebro fetal, essa diferença não é observada. Em conjunto, nossos resultados indicam que os transcritos alternativos de *RECK* apresentam padrões de expressão tecido-específicos e que há uma variação

expressiva quando da análise do balanço entre a expressão dos transcritos alternativos e canônico em tecidos humanos normais.

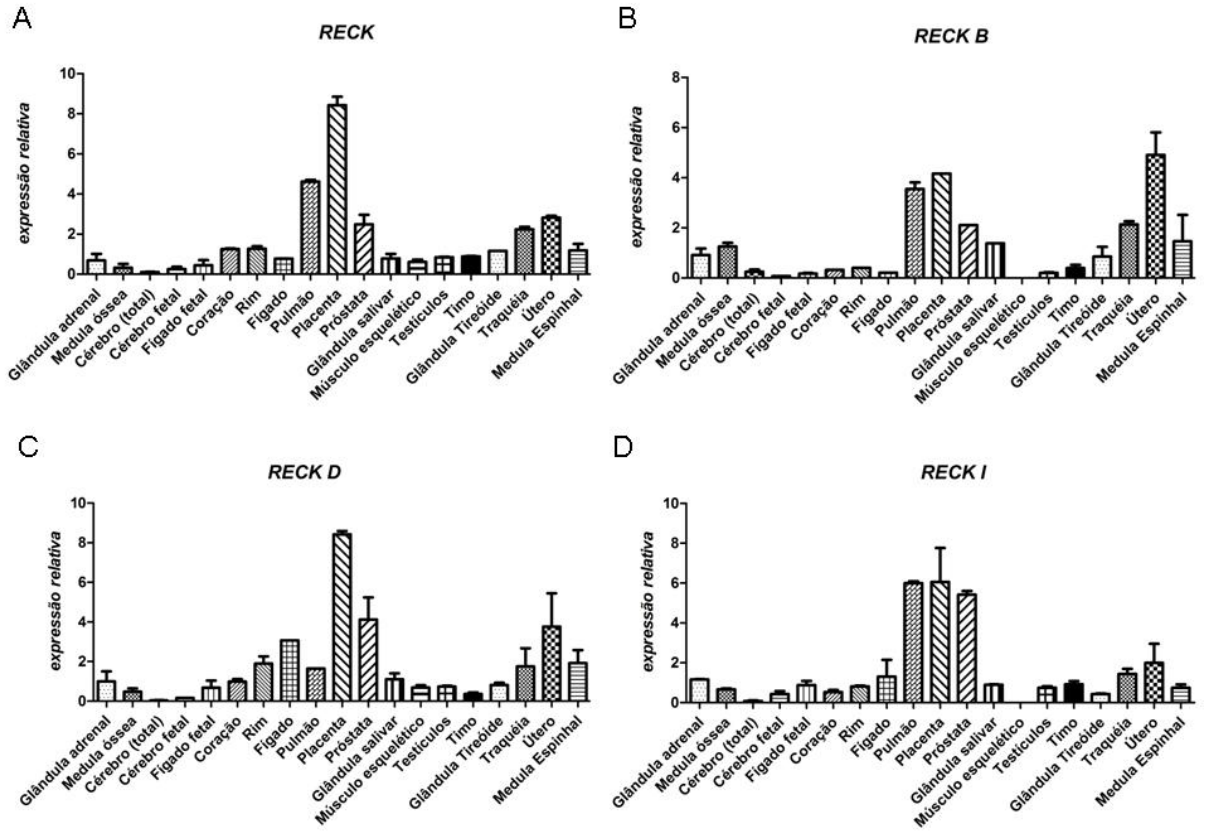


Figura 4.1.5.1.: Expressão relativa dos transcritos alternativos de *RECK* em um painel de RNA de tecidos normais (Human Total RNA Master Panel II/ Clontech). Expressão relativa de cada uma das variantes de *RECK* estabelecida por qRT-PCR. A – *RECK* canônico; B – *RECK-B*; C – *RECK-D*; e D – *RECK-I*. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de *HPRT* e *GAPDH*, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em dois experimentos independentes, realizados em triplicata.

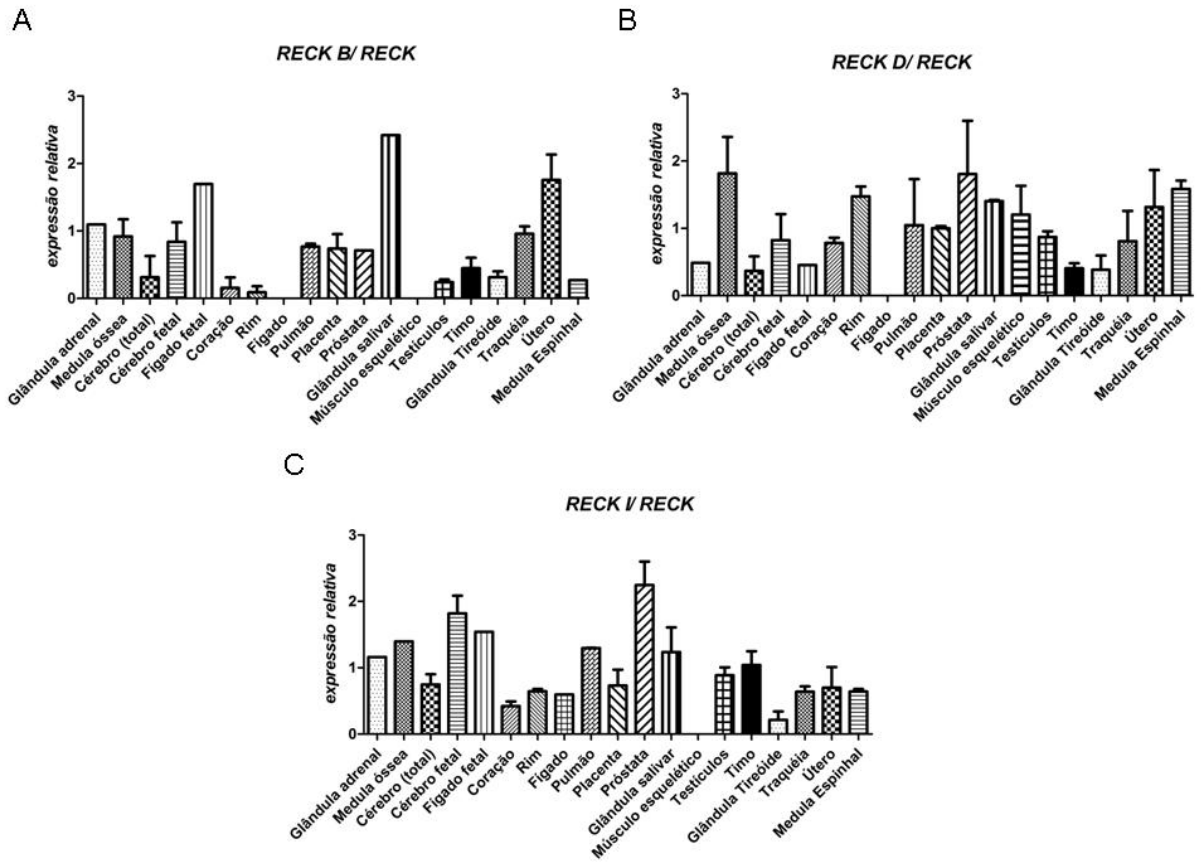


Figura 4.1.5.2.: Expressão relativa dos transcritos alternativos de *RECK* em função da expressão do transcrito canônico em um painel de RNA de tecidos normais (Human Total RNA Master Panel II/ Clontech). A expressão relativa de cada uma das variantes de *RECK* expressas na Figura 4.1.5.1. foi normalizada pela expressão relativa do transcrito canônico. A – *RECK-B*; B – *RECK-D*; e C – *RECK-I*.

4.2. As variantes de *splicing* de *RECK* e seu envolvimento na biologia de astrocitomas

Os Glioblastomas multiformes (astrocitomas grau IV) são caracterizados por sua alta invasividade do tecido normal adjacente. Levando-se em consideração que RECK canônico está envolvido na modulação do remodelamento da MEC por inibir a atividade de MMPs, a progressão de astrocitomas foi selecionada como modelo para o estudo do perfil de expressão das variantes de *RECK* e a linhagem U87 MG, de GBM humano, foi selecionada como modelo para o estudo funcional das isoformas.

4.2.1. Perfil de expressão dos transcritos de *RECK, MMPs* e *TIMPs* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade

Foram determinados os perfis de expressão dos transcritos canônico e alternativos de *RECK* assim como aqueles dos transcritos correspondentes à proteases alvos da inibição de RECK canônico (*MMP-2, -9* e *-14*), e aos inibidores teciduais endógenos de MMPs (*TIMP-1,-2,-3* e *-4*) em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Foram utilizadas amostras de pacientes com astrocitomas grau I (n=15), II (n=15), III (n=15), e IV (n=30), assim como um grupo de amostras controle não-tumoral, constituída de tecidos provenientes de lobotomia temporal de pacientes epilépticos (n=15). As amostras teciduais, cedidas pela Profa. Suely Kazue Nagahashi Marie da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram macrodissecadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, conforme descrito na sessão 3.4.

Os resultados de qRT-PCR mostrados nesta sessão representam os valores médios obtidos, em triplicata, correspondentes à duas sínteses distintas de cDNA para cada amostra. Os dados de expressão gênica relativa foram calculados utilizando-se a média dos valores obtidos no grupo controle não-tumoral como referência. Os níveis de expressão relativa, correspondentes aos genes *GAPDH, HPRT* e *HMBS*, foram utilizados para determinação do Fator de Normalização, pela ferramente GenNorm (Vandesompele, De Preter *et al.,* 2002). Todos os resultados de expressão gênica relativa apresentados a seguir utilizam este Fator de Normalização como controle endógeno das reações de qRT-PCR.

Os resultados mostram que *MMP-2, -9,* e *-14* apresentaram alta expressão em astrocitomas (Figura 4.2.1.1), corroborando dados prévios da literatura (Forsyth,

Wong, *et al.*, 1999) (Itoh, Matsuda *et al.,*2002; Brell, Ibanez *et al.,* 2011; Gabelloni, DaPozzo *et al.,* 2010; Isaka, Nishi *et al*., 2003; Hagemann, Anacker *et al*., 2012). Dentre as MMPs, a expressão de *MMP-9* se destaca por apresentar um aumento acentuado em astrocitomas de alto grau (Figura 4.2.1.1 - B).

Quando analisados os perfis de expressão dos inibidores endógenos de MMPs, observa-se que *TIMP-2* não apresenta modulação em astrocitomas de diferentes graus de malignidade, o que também está de acordo com os dados da literatura (Groft, Muzik *et al*., 2001)(Figura 4.2.1.2 - B). Em contraste, a expressão de *TIMP-1* apresenta uma tendência a aumentar conforme aumenta a agressividade do tumor, corroborando dados da literatura, já que é utilizado como um marcador de malignidade e de um pobre prognóstico em GBM (Polisetty, Gupta *et al*., 2011) (Aaberg-Jessen, Christensen *et al.,* 2009) (Figura 4.2.1.2 - A), enquanto a expressão de *TIMP-3* e *-4* diminui conforme aumenta o grau de agressividade do tumor (Figura 4.2.1.2 – C e D).

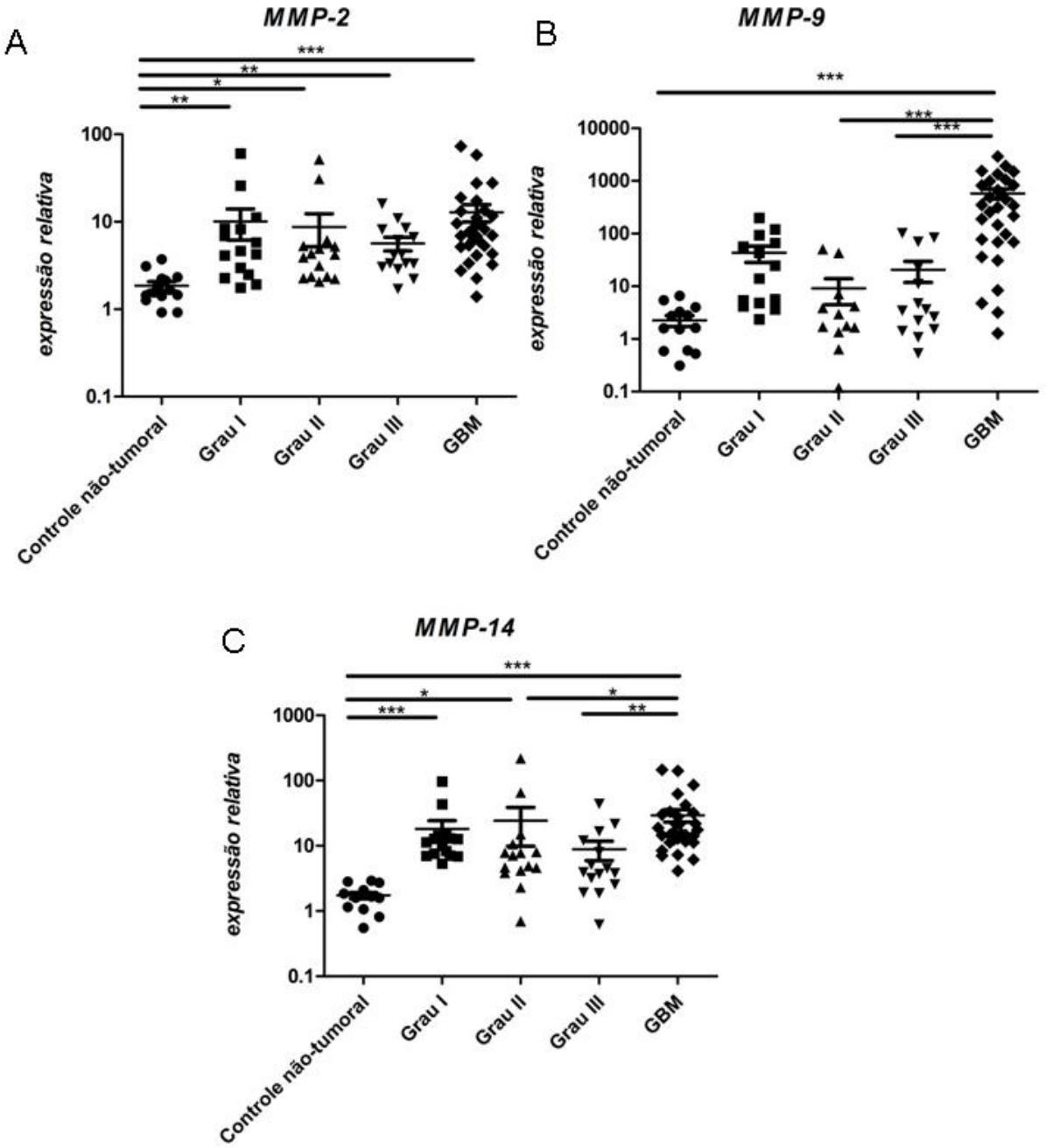


Figura 4.2.1.1.: Perfil de expressão de MMPs em astrocitomas de diferentes graus. Análise do perfil de expressão de *MMP-2* (A), *-9* (B), e *-14* (C). Amostras de lobotomia temporal de pacientes epilépticos foram utilizadas como controle não-tumoral (n=14), e amostras tumorais foram obtidas de pacientes com astrocitomas grau I (n=15), II (n=15), III (n=15), e IV (n=30). Os níveis de expressão de *GAPDH, HPRT* e *HMBS* foram utilizados como controle endógeno para normalização através do programa GenNorm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn's. * representa p<0,05, **, p<0,01 e *** p<0,001.

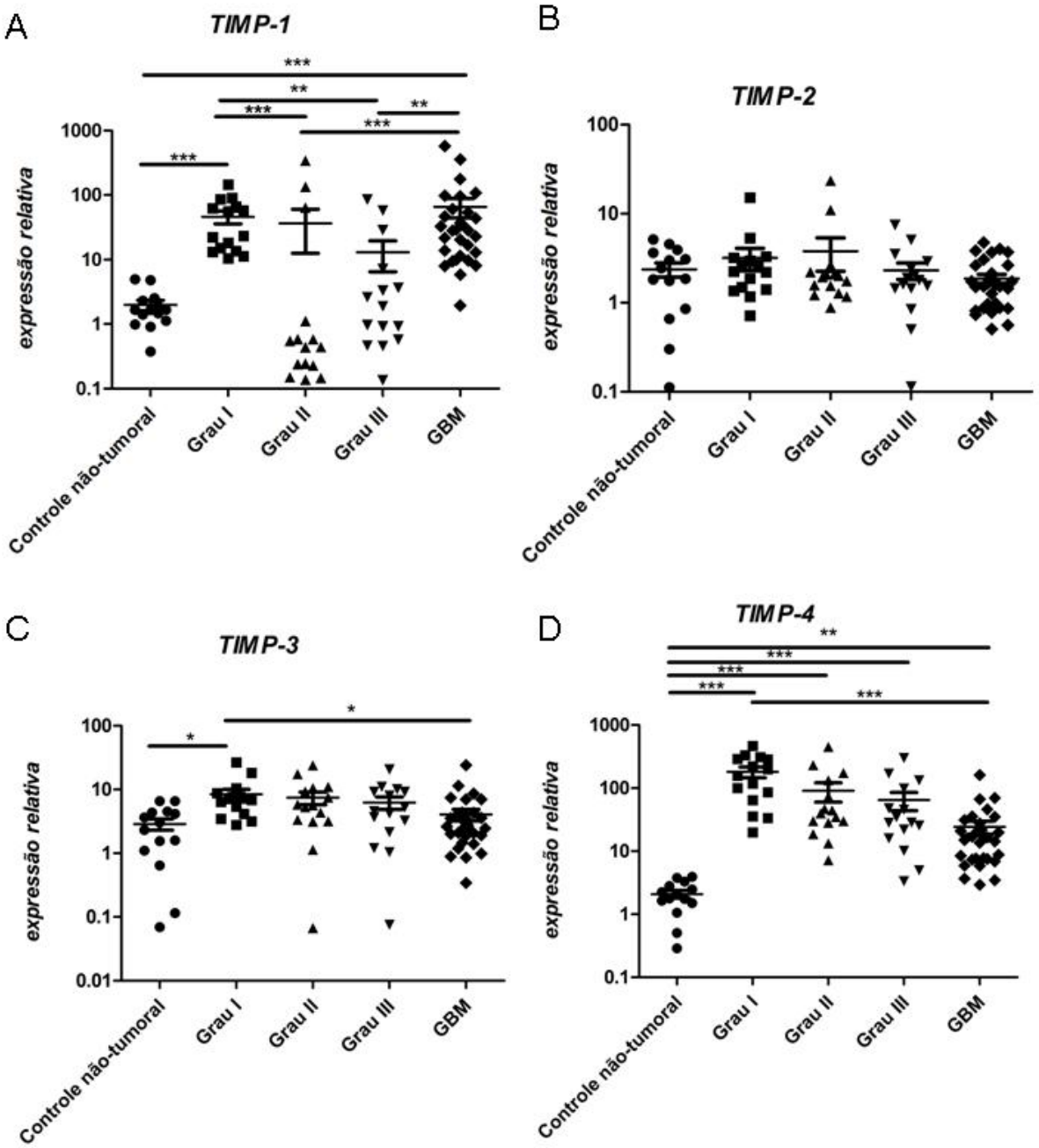


Figura 4.2.1.2.: Perfil de expressão de *TIMPs* em astrocitomas de diferentes graus. Análise do perfil de expressão de *TIMP-1* (A), *-2* (B), *-3* (C), e *-4* (D). Amostras de lobotomia temporal de pacientes epilépticos foram utilizadas como controle não-tumoral (n=14), e amostras tumorais foram obtidas de pacientes com astrocitomas grau I (n=15), II (n=15), III (n=15), e IV (n=30). Os níveis de expressão de *GAPDH, HPRT* e *HMBS* foram utilizados como controle endógeno para normalização através do programa GenNorm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn's. * representa $p<0.05$, **, $p<0.01$ e *** $p<0.001$.

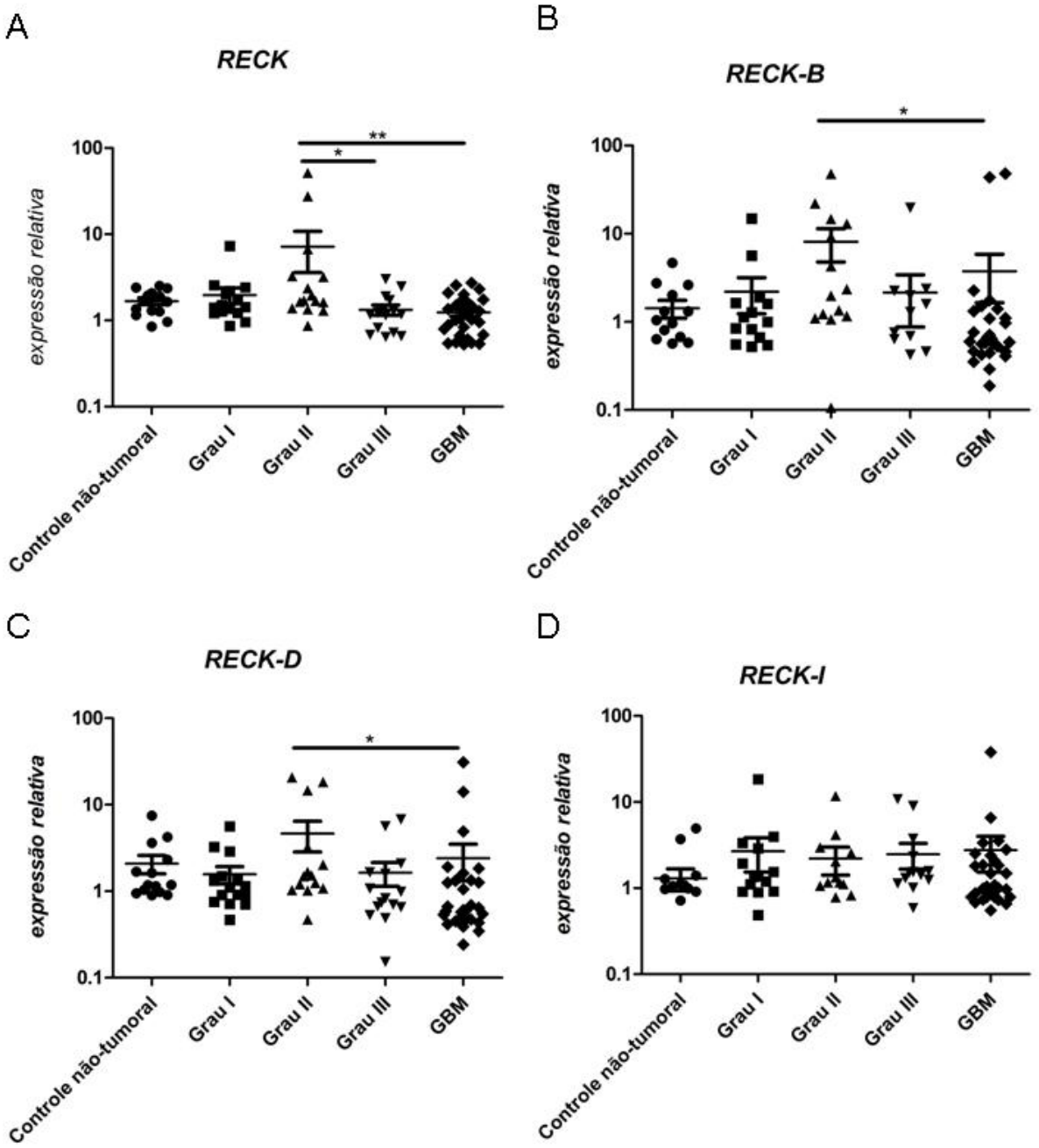


Figura 4.2.1.3.: Perfil de expressão dos transcritos de *RECK* em astrocitomas de diferentes graus. Análise do perfil de expressão de *RECK* (A), *RECK-B* (B), *RECK-D* (C), e *RECK-I* (D). Amostras de lobotomia temporal de pacientes epilépticos foram utilizados como controle não-tumoral (n=14), e amostras tumorais foram obtidas de pacientes com astrocitomas grau I (n=15), II (n=15), III (n=15), e IV (n=30). Os níveis de expressão de *GAPDH, HPRT* e *HMBS* foram utilizados como controle endógeno para normalização através do programa GenNorm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn's. * representa p<0,05, e **, p<0,01.

A expressão de *RECK* canônico diminui durante a progressão de astrocitomas de grau II a IV (GBMs) (Figura 4.2.1.3- A), sendo importante ressaltar que tumores de grau II tem a tendência natural a progredirem para tumores de graus III e IV. Em geral, todos os transcritos alternativos de *RECK* apresentam um padrão de expressão mais variável e disperso dentro de um mesmo grau histológico quando comparado ao padrão de expressão do transcrito canônico. *RECK-B* e *RECK-D* apresentam uma diminuição de sua expressão ao longo do aumento da malignidade de astrocitomas de grau II a IV, assim como a variante canônica (Figura 4.2.1.3.– B e C). Por outro lado, *RECK-I* aparentemente não é modulado em diferentes graus de astrocitomas (Figura 4.2.1.3. - D). Os balanços entre os níveis de expressão dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à variante canônica aparentemente não são modulados conforme o aumento da malignidade de astrocitomas. Além disso, as medianas destas razões estão próximas a um, indicando que as a magnitude dos níveis de expressão dos quatro transcritos de *RECK* são em geral equivalentes (Figura 4.2.1.4.).

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que os transcritos *RECK, RECK-B*, e *RECK-D* apresentam o mesmo perfil de expressão ao longo do aumento da malignidade de astrocitomas, com uma menor expressão em GBMs quando comparados com astrocitomas grau II, assim como *TIMP-3* e *-4*, que apresentam uma diminuição em seus níveis de expressão conforme o aumento da malignidade. *TIMP-1*, marcador de malignidade em GBM, assim como *MMP-9*, apresenta maior expressão nos tumores mais agressivos. Todas as MMPs apresentam maior expressão nas amostras tumorais, quando comparadas ao controle e aparentemente *RECK-I* e *TIMP-2* não apresentam modulação significativa nesse modelo.

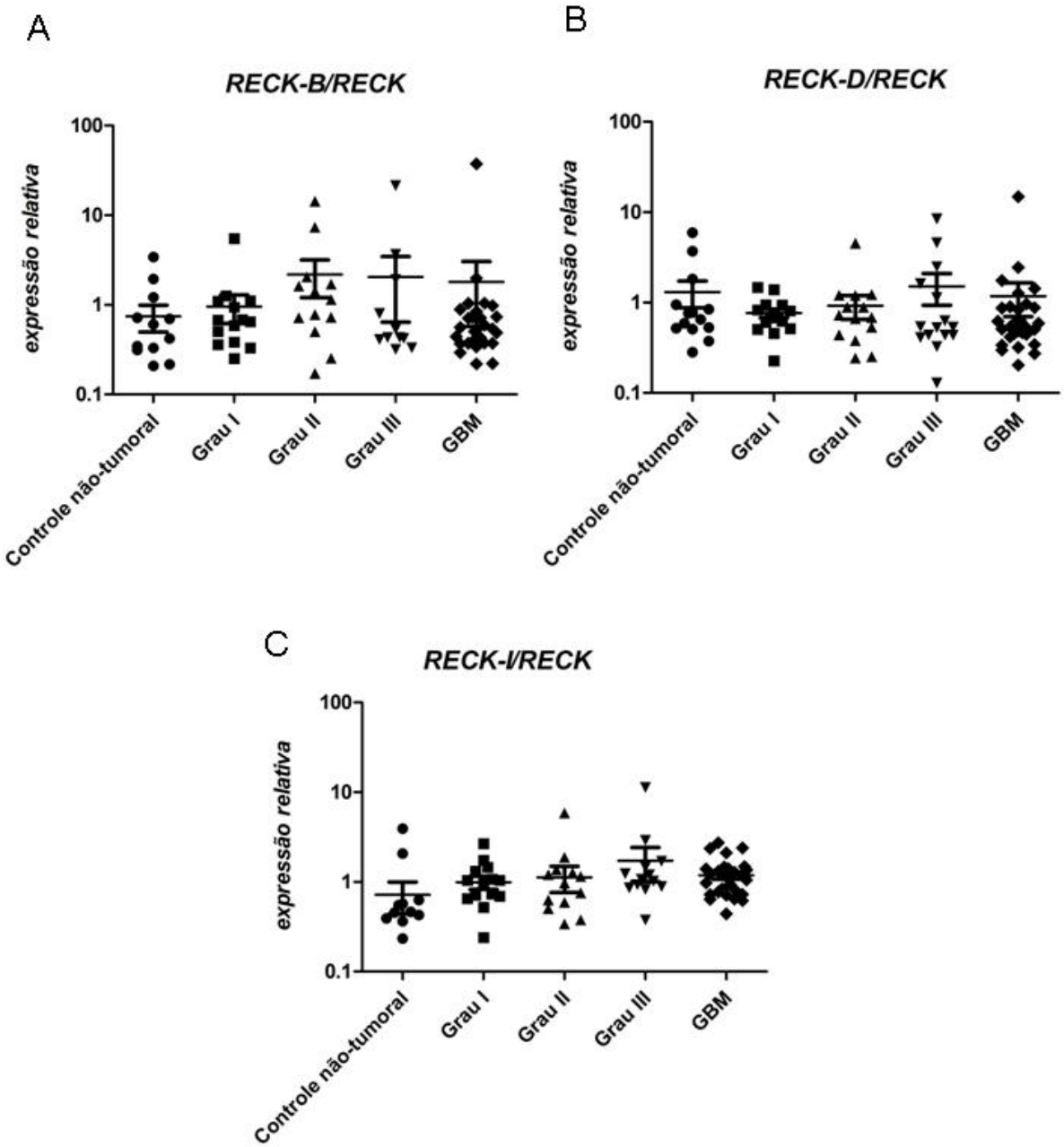


Figura 4.2.1.4.: Balanço entre os níveis de expressão dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à variante canônica em astrocitomas de diferentes graus. Estão representadas as razões *RECK-B/ RECK* (A), *RECK-D/ RECK* (B) e *RECK-I/ RECK* (C). Amostras de lobotomia temporal de pacientes epilépticos foram utilizados como controle não-tumoral (n=14), e amostras tumorais foram obtidas de pacientes com astrocitomas grau I (n=15), II (n=15), III (n=15), e IV (n=30). Os níveis de expressão de *GAPDH, HPRT* e *HMBS* foram utilizados como controle endógeno para normalização através do programa GenNorm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn's. Nenhuma significância estatística foi encontrada.

4.2.2. Correlação entre os níveis de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em astrocitomas de diferentes graus de malignidade

A partir dos resultados obtidos através dos ensaios de qRT-PCR, foi possível avaliar a existência de uma correlação entre os níveis de expressão de mRNA dos transcritos de *RECK (RECK, RECK-B, RECK-D e RECK-I)*, e os níveis de expressão as metaloproteinases de matriz (*MMP-2, MMP-9* e *MMP-14*), e seus inibidores (*TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3* e *TIMP-4*), durante a progressão de astrocitomas. Para tanto, os dados de expressão gênica relativa de cada um destes genes foram submetidos à análise estatística de Correlação de Spearman.

Observa-se que, como esperado, a expressão de todos os transcritos de *RECK* correlacionam positivamente entre si ($p < 0,001$). A expressão de *TIMP-2* correlaciona positivamente com os níveis de expressão de *RECK* ($p < 0,001$), *RECK-B* ($p < 0,05$) e *RECK-I* ($p < 0,01$). A expressão de *RECK* canônico também correlaciona positivamente com a expressão de *TIMP-3* ($p < 0,001$) e a expressão de *RECK-I* está correlacionada positivamente com os níveis de expressão *de MMP-2* ($p < 0,001$), *MMP-14* ($p < 0,001$) e *TIMP-1*($p < 0,01$) (Tabela 4.2.2.).

	RECK	*RECK-B*	*RECK-D*	*RECK-I*	*MMP-2*	*MMP-9*	*MMP-14*	*TIMP-1*	*TIMP-2*	*TIMP-3*	*TIMP-4*
RECK		**r=0,4182; p<0,0001**	**r =0,4550; p<0,0001**	**r =0,4364; p<0,0001**	r =0,1680; ns	r=-0,04421; ns	r =0,1838; ns	r=0,06437 ; ns	**r =0,5413; p<0,0001**	**r =0,3969; p<0,0001**	r=0,1135; ns
RECK-B	**r =0,4182; p<0,0001**		**r =0,5302; p<0,0001**	**r =0,2782; p=0,0083**	r=0,08808 ; ns	r=0,008483 ; ns	r=0,05967; ns	r=0,1285; ns	**r =0,2657; p=0,0119**	r=0,05807; ns	r =0,1349; ns
RECK-D	**r =0,455; p<0,0001**	**r =0,5302; p<0,0001**		**r =0,4326; p<0,0001**	r =0,1867; ns	r=-0,03453; ns	r=0,03829; ns	r=0,0724; ns	r= 0,2021; ns	r =0,04757; ns	r=-0,0313; ns
RECK-I	**r = 0,4364; p<0,0001**	**r= 0,2782; p=0,0083**	**r= 0,4326; p<0,0001**		**r= 0,4303; p<0,0001**	r= 0,1873; ns	**r= 0,4041; p<0,0001**	**r= 0,3212; p=0,0021**	**r=0,2815; p=0,0075**	r= 0,1156; ns	r= 0,1750; ns

Tabela 4.2.2.: Correlação entre as expressões relativas dos transcritos de *RECK* e das metaloproteinases de matriz e de seus inibidores durante a progressão de astrocitomas. Teste de não paramétrico de correlação de Spearman entre os níveis de expressão relativa dos transcritos analisados.Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$), r representa o coeficiente de Spearman, e ns indica não-significativo.

4.2.3. Correlação entre a expressão e o balanço dos níveis de expressão dos transcritos de *RECK* e a sobrevida global de pacientes com GBM

A associação entre os níveis de expressão de *RECK* e o tempo de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com GBM foi analisada através da curva de Kaplan-Meier. O grupo de amostras correspondente aos GBMs (grau IV) foi subdividido em dois grupos, pelo valor da mediana da expressão de *RECK* canônico. Observou-se que o grupo de pacientes com maior expressão de *RECK* canônico apresenta também maior sobrevida global (Figura 4.2.3.1. A).

Este grupo também apresenta uma maior razão entre a expressão de *RECK* canônico em relação a todas as variantes alternativas de *RECK* (Figura 4.2.3.1. B - D), o que é observado apesar do fato das amostras com maior expressão de *RECK* canônico também apresentarem, no geral, maior expressão das variantes *RECK-B, -D* e *–I*, mostrando que a tendência observada não se deve ao aumento da expressão de *RECK* por si só (Figura 4.2.3.2.).

Os resultados indicam que a expressão do transcrito canônico de *RECK* tem potencial valor prognóstico para pacientes com GBM. Além disso, a análise do balanço entre os níveis de expressão dos diferentes transcritos de *RECK* pode contribuir para tornar mais precisa sua aplicação como marcador prognóstico para este tipo de tumor.

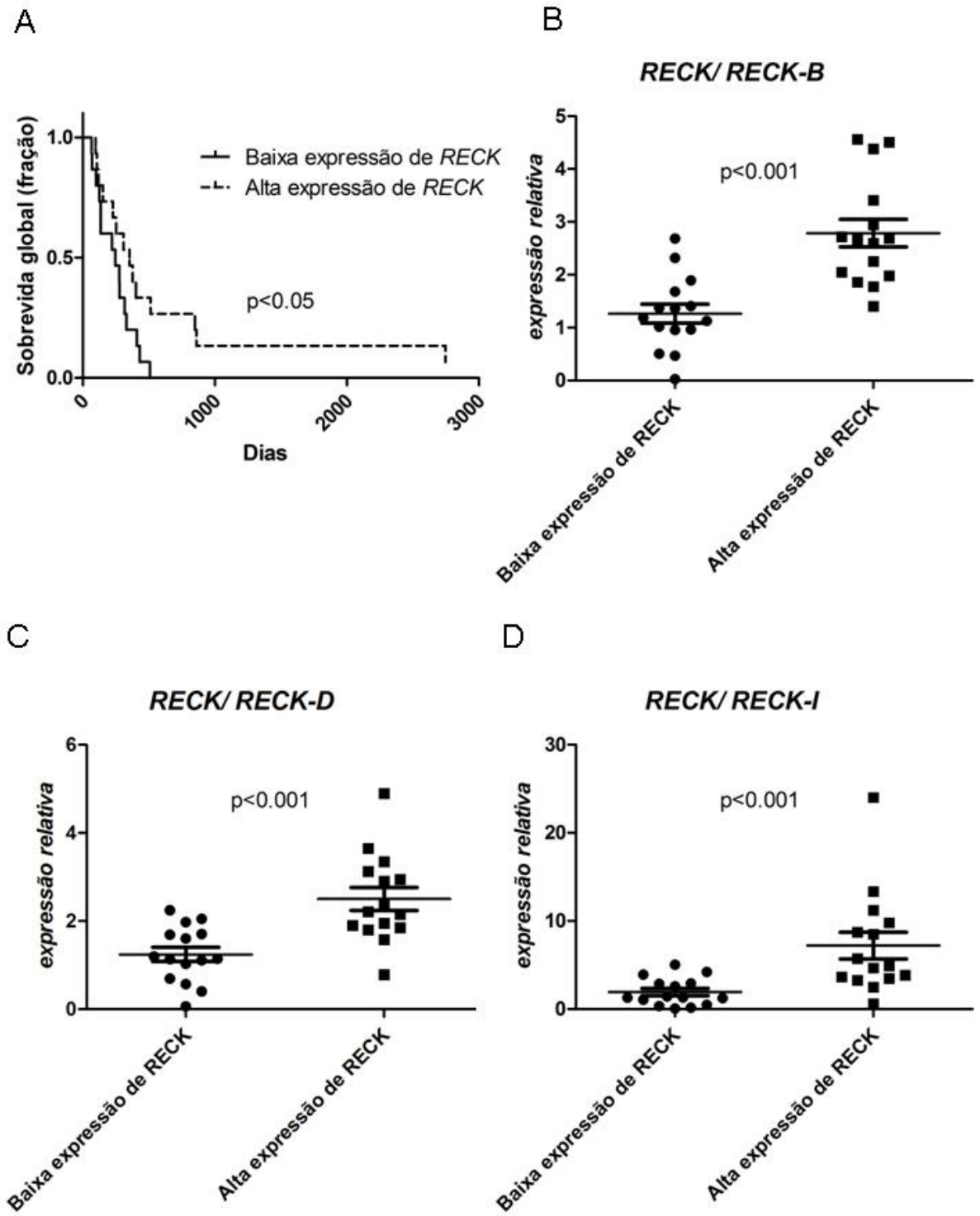


Figura 4.2.3.1.: Curva de sobrevida global de pacientes com GBM em função da expressão de *RECK*. Os pacientes foram divididos em dois grupos pelo valor da mediana da expressão de *RECK* canônico em: um grupo com alta expressão e um grupo com baixa expressão. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank (A). Análise do balanço de expressão do transcrito canônico em relação às variantes *RECK-B* (B), *RECK-D* (C) e *RECK-I* (D) foi realizada. O teste de Mann-Whitney teste-t foi utilizado para a comparação entre os grupos. Os valores de *p* em destaque indicam as correlações consideradas significativas.

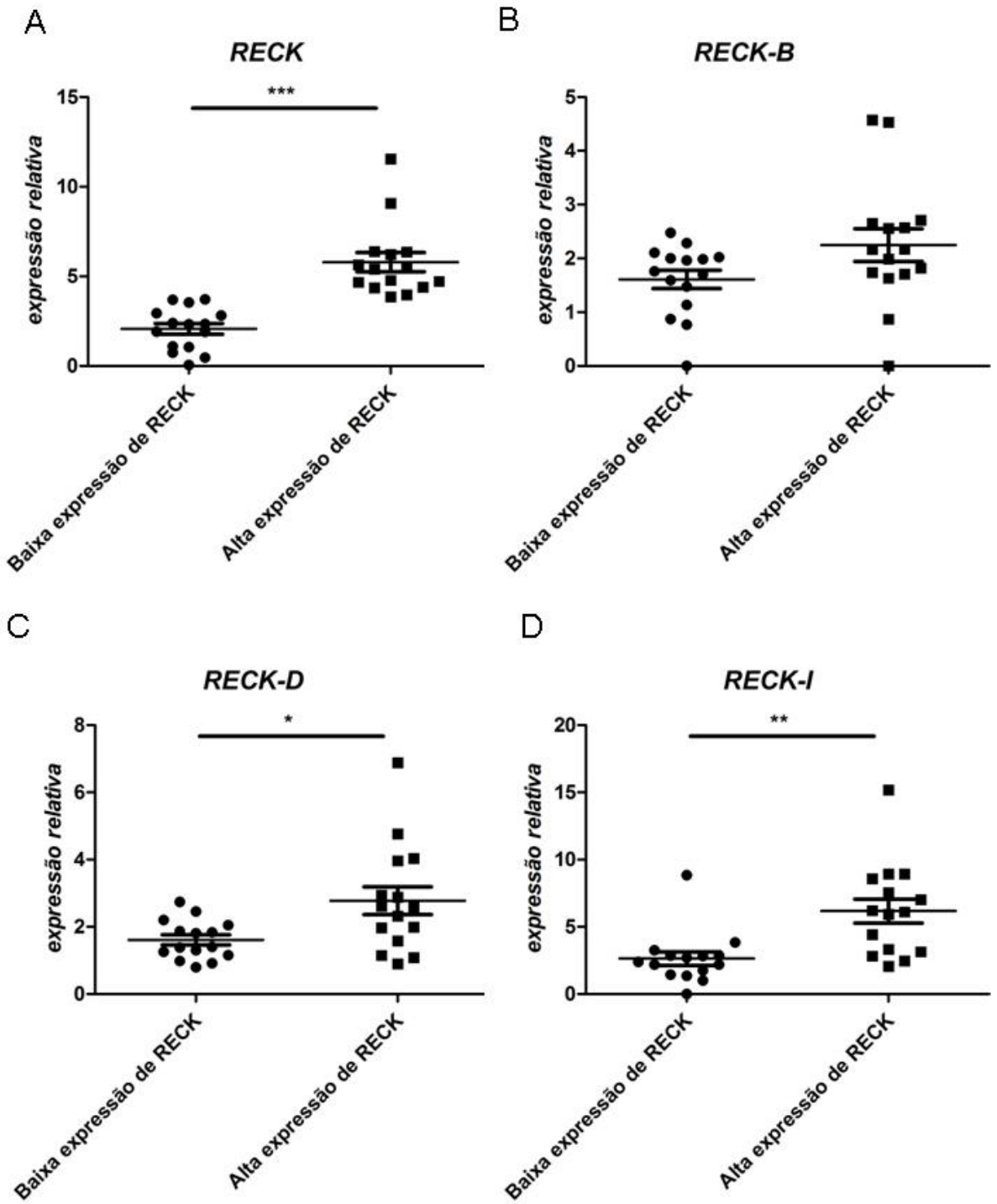


Figura 4.2.3.2.: Expressão relativa dos transcritos de RECK em pacientes com GBM divididos em dois grupos. Os pacientes foram divididos em dois grupos pelo valor da mediana da expressão de *RECK* canônico em: um grupo com alta expressão e um grupo com baixa expressão. A expressão relativa dos transcritos de RECK nos dois grupos está representada: *RECK* (A), *RECK-B* (B), *RECK-D* (C) e *RECK-I* (D). O teste de Mann-Whitney teste-t foi utilizado para a comparação entre os grupos. * representa p< 0,05, ** representa p< 0,01 e *** representa p< 0,001.

4.2.4. Análise funcional das isoformas de RECK em linhagem de Glioblastoma Multiforme humano

Os resultados apresentados nas sessões anteriores indicam que as variantes de *RECK* são potenciais biomarcadores em modelo de GBM humano. Para tentar esclarecer as bases moleculares da correlação positiva observada entre o balanço dos níveis de expressão dos transcritos de *RECK* e a sobrevida de pacientes, é importante realizar o estudo funcional das isoformas de RECK neste modelo. Este estudo funcional foi realizado em células U87 MG de GBM humano.

4.2.4.1 Estabelecimento de linhagens derivadas de U87 MG superexpressando cada uma das isoformas de RECK

As sequências referentes às regiões do quadro aberto de leitura de cada uma das variantes alternativas de *RECK* foram clonadas no vetor de expressão pLV (sessão 3.6.2.), vetor plasmideal de transferência lentiviral de terceira geração, que possui, como gene repórter, a sequência codificadora de EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) (Tiscomia, Singer *et al.,* 2006). A produção de partículas virais contendo as construções pLV-vazio, pLV-RECK-B, pV-RECK-D ou pLV-RECK-I e a transdução de células U87 MG foram realizadas conforme descrito na sessão 3.11, utlilizando-se uma MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 100 para cada construção.

Para enriquecer a população celular que foi transduzida, as células foram submetidas à seleção através de citometria (*cell sorting*), utilizando-se a expressão de EGFP como parâmetro, no citometro FACS Aria I/II (BD Biosciences), como descrito na sessão 3.11.4 e ilustrado na Figura 3., de modo que as populações finais apresentassem pureza igual ou maior que 96%.

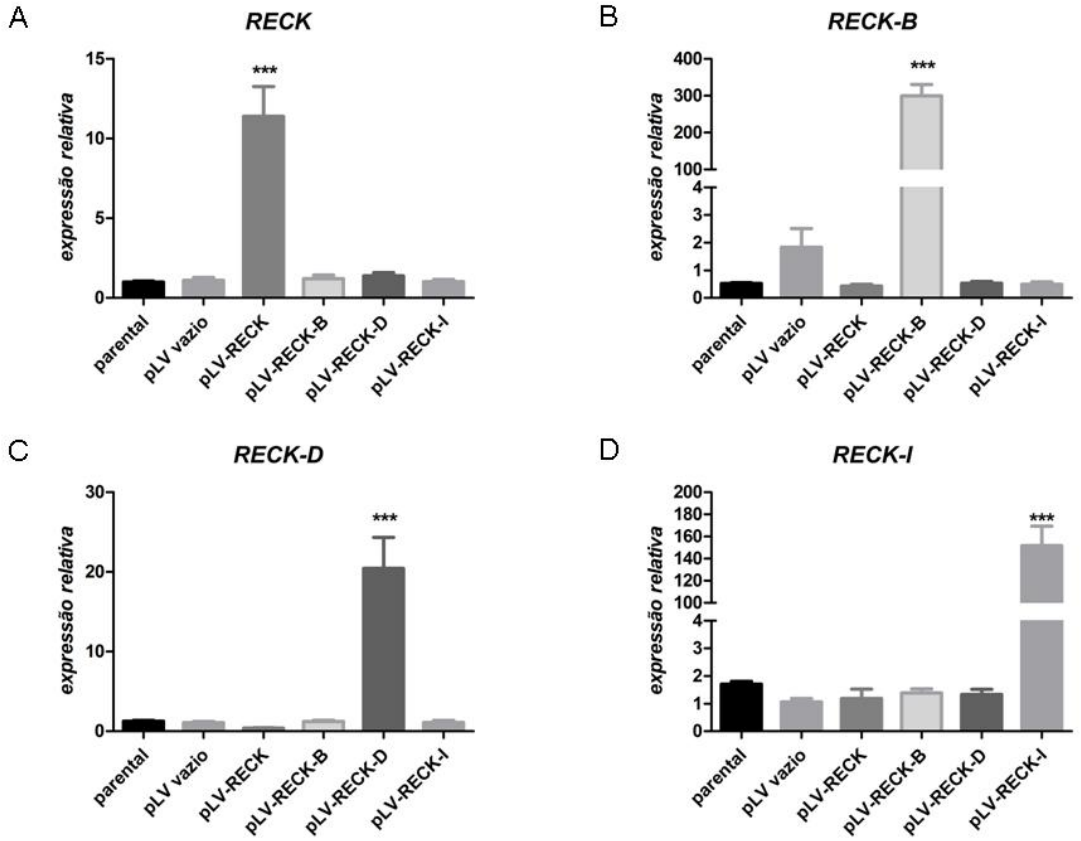


Figura 4.2.4.2.: Expressão de mRNA nas linhagens derivadas de U87 MG geradas expressando cada uma das variantes de *RECK*. Perfil de expressão de mRNA dos transcritos *RECK* (A), *RECK-B*(B), *RECK-D* (C) e *RECK-I* (D), nas linhagens transduzidas com as construcões pLV vazio (controle). pLV-RECK, pLV-RECK-B, pLV-RECK-D e pLV-RECK-I indicadas. Expressão relativa determinada através de ensaios de qRT-PCR utilizando-se a expressão de *GAPDH, HPRT* e *HMBS* como controle endógeno para normalização através do programa GenNorm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer. *** representa p<0,001, neste caso, da coluna na qual está indicado contra todos as outras.

Para confirmação da expressão diferencial das variantes de *RECK* nas linhagens derivadas de U87 MG geradas, foram realizados ensaios de qRT-PCR (Figura 4.2.4.2), demonstrando-se a superexpressão de *RECK* canônico em células U87 pLV-RECK, de *RECK-B* em células U87 pLV-RECK-B, de *RECK-D* em células U87 pLV-RECK-D, e de *RECK-I* em células U87 pLV-RECK-I, conforme esperado, com significância p<0,001 em todos os casos.

4.2.4.2. Análise da taxa de proliferação celular de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK

Uma vez estabelecidas as linhagens derivadas de U87 MG superexpressando as diferentes isoformas de RECK, de modo a avaliar a influência destas proteínas no processo de proliferação celular, ensaios de curvas de crescimentos foram realizados como descrito na sessão 3.15.

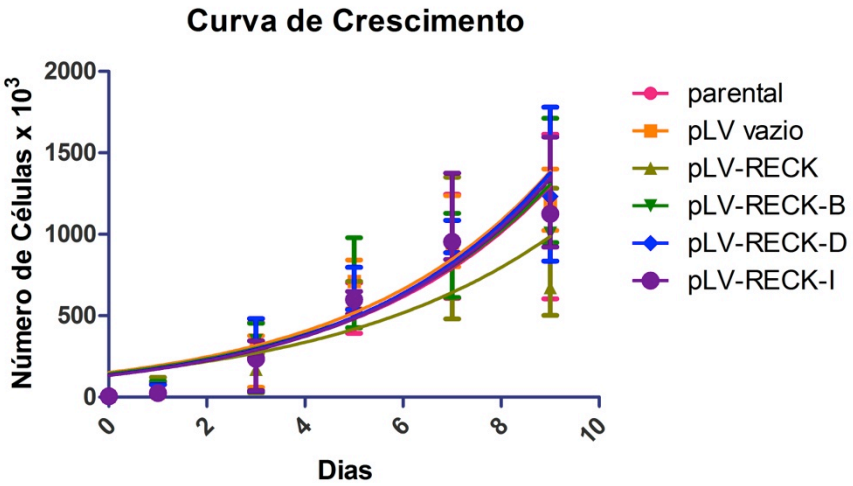


Figura 4.2.4.2.1: Análise da taxa de proliferação de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK. Ensaios de curva de crescimento foram realizados plaqueando-se 5.10^4 células em placas de 35 mm de diâmetro. As linhagens analizadas foram: U87 MG parental, e transduzidas com os vetoroes: pLV vazio, pLV-RECK, pLV-RECK-B, pLV-RECK-D e pLV-RECK-I. Após 1, 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo, estas células foram coletadas e contadas. Estão representados três experimentos independentes em triplicata.

As curvas de crescimento geradas (Figura 4.2.4.2.1.) permitiram a determinação do tempo de dobramento, assim como da densidade da saturação de cada linhagem (Figura 4.2.4.2.2. e Tabela 4.2.4.2.). Observa-se que apesar das

células que superexpressam a isoforma canônica de RECK apresentarem uma tendência à menor densidade de saturação e maior tempo de dobramento, essa diferença não é significativa. Conclui-se, a partir dos resultados obtidos, que as isoformas de RECK não influenciam a taxa de crescimento celular ou a densidade de saturação de células U87 MG.

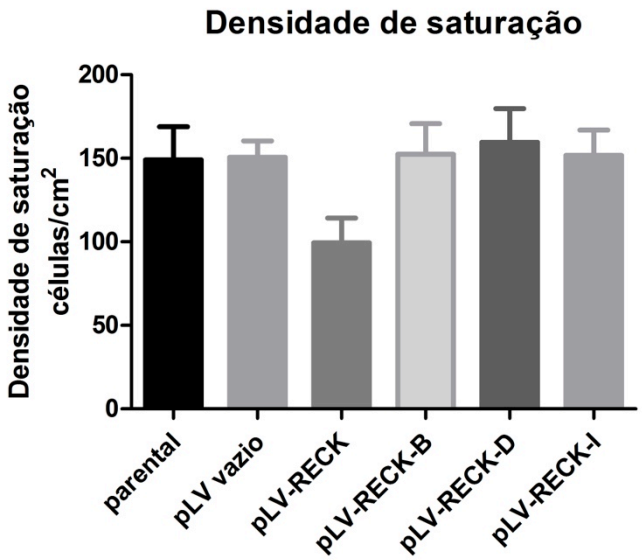


Figura 4.2.4.2.2: Análise da densidade de saturação de délulas U87 MG superexpressando as isoformas de RECK. O número total de células obtido por poço no dia 9 da curva de crescimento, onde a curva já atingiu um platô, foi dividida pela área da placa de cultura. As linhagens analizadas foram: U87 MG parental, e transduzidas com os vetores: pLV vazio, pLV-RECK, pLV-RECK-B, pLV-RECK-D e pLV-RECK-I. Estão representados três experimentos independentes em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilisando-se teste de variância ANOVA seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

Tabela 4.2.4.2. Tempo de dobramento e densidade de saturação das linhagens U87 MG superexpressando as isoformas de RECK. O valor expresso é a média de três experimentos independentes em triplicata.

Linhagem	Tempo de dobramento Dias	Densidade de saturação células/ mm^2
U87 MG	2,792	149
U87 pLV-vazio	2,819	150
U87 pLV-RECK	3,224	99
U87 pLV-RECK-B	2,834	152
U87 pLV-RECK-D	2,695	159
U87 pLV-RECK-I	2,708	152

4.2.4.3. Análise da capacidade migratória de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK

Para avaliar a influência destas proteínas no processo de migração celular, a capacidade migratória destas células foi avaliada através de duas abordagens distintas *in vitro*.

Numa primeira abordagem, as células superexpressando cada isoforma de RECK, assim como os controles, foram plaqueadas sobre insertos do tipo Transwell™ em placas de 24 poços e mantidas em cultura por 24h. No compartimento do poço abaixo do inserto adicionou-se meio DME 10% SFB, que funciona como um quimiotático para as células, sendo que as células ficam no compartimento superior, em meio DME sem soro. Após este período, determinou-se o número de células que foram capazes de migrar para a porção inferior destes insertos (descrito em 3.17.1.) (Figura 4.2.4.3.1.).

A segunda abordagem consistiu do ensaio de migração celular por ranhura (*scratching*), na qual um risco contínuo foi feito com o auxílio de uma ponteira de 200 µL numa monocamada confluente das células analisadas. Imagens do mesmo campo de cada poço foram obtidas após 4h e a diferença na fração da área da placa ocupada pelas células foi medida (descrito em 3.17.1.) (Figura 4.2.4.3.1.).

Enquanto no ensaio de migração por Transwell™ não se observou diferença alguma no potencial migratório das células U87 expressando as diferentes isoformas de RECK, utilizando-se no ensaio de migração por *scratching,* observa-se que células superexpressando a proteína canônica de RECK apresentam uma menor capacidade migratória. Conclui-se, portanto, que, apesar de RECK canônica ter uma pequena influência no processo de migração celular em monocamada de plástico, suas isoformas alternativas não influenciam a migração de células U87 MG.

.

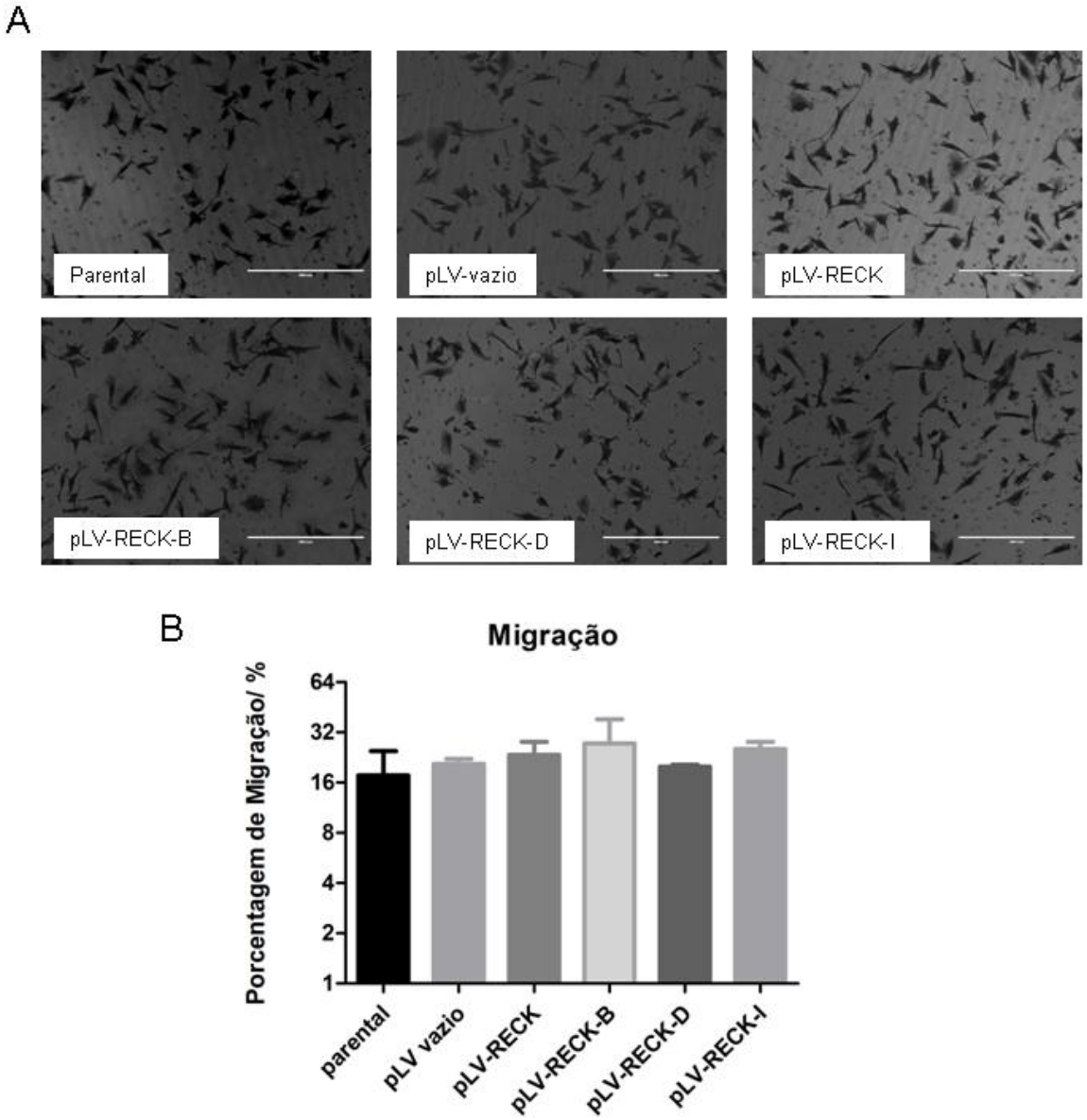


Figura 4.2.4.3.1.: Análise da capacidade de migração por Transwell^{TM} de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK. A - Após 24h, as células presentes na porção inferior dos insertos foram fixadas, coradas e documentadas. Fotos representativas são apresentadas para cada linhagem. B – Quantificação dos resultados, apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

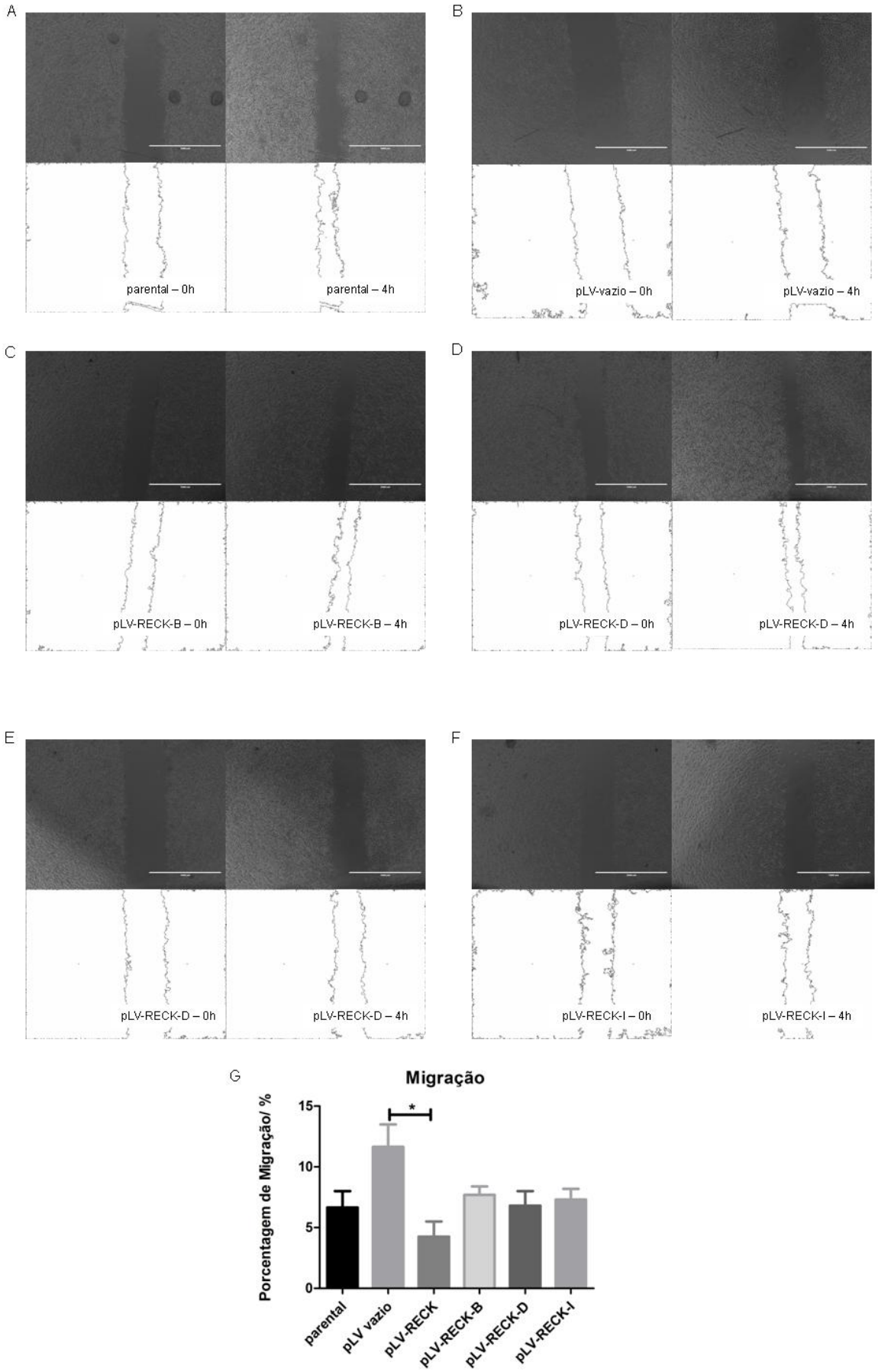

A
parental – 0h
parental – 4h
B
pLV-vazio – 0h
pLV-vazio – 4h
C
pLV-RECK-B – 0h
pLV-RECK-B – 4h
D
pLV-RECK-D – 0h
pLV-RECK-D – 4h
E
pLV-RECK-D – 0h
pLV-RECK-D – 4h
F
pLV-RECK-I – 0h
pLV-RECK-I – 4h
G
Migração
Porcentagem de Migração/ %
15
10
5
0
*
parental
pLV vazio
pLV-RECK
pLV-RECK-B
pLV-RECK-D
pLV-RECK-I

Figura 4.2.4.3.2.: Análise da capacidade de migração por ensaio de *scratching* de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK. Experimentos representativos para cada linhagem estão ilustrados. A – U87 MG, B – U87 pLV-vazio, C – U87 pLV-RECK, D - U87 pLV-RECK-B, E - U87 pLV-RECK-D, e F - U87 pLV-RECK-I. Em cada item o painel da esquerda representa as células logo após a realização do risco – 0h; e no painel da direita, o mesmo campo após 4h. Abaixo de cada painel estão representadas suas áreas correspondentes, que foram geradas e analisadas com auxilio do programa ImageJ. G – Quantificação da fração de área do risco preenchida pelas células após 4h. Estão representados três experimentos independentes em triplicata, média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer. * representa $p < 0.05$.

4.2.4.4. Análise da capacidade invasiva de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK

A proteína RECK canônica está envolvida com a inibição da atividade de MMP-2, -9 e -14. Tais MMPs são essenciais para o processo de invasão celular, particularmente em GBMs, tendo sua função bem caracterizada. Dessa forma, para avaliar a influência destas proteínas no processo de invasão celular, as células superexpressando cada isoforma de RECK, assim como os controles, foram plaqueadas sobre insertos do tipo Transwell™, revestidos com a MEC reconstituida Matrigel, em placas de 24 poços e mantidas em cultura por 24h. No compartimento do poço abaixo do inserto adicionou-se meio DME 10% SFB que atua como um quimiotático para as células, enquanto as células ficam no compartimento superior em meio DME sem soro. Após este período, determinou-se o número de células que foram capazes de degradar o Matrigel e migrar para a porção inferior destes insertos (descrito em 3.18.) (Figura 4.2.4.4.).

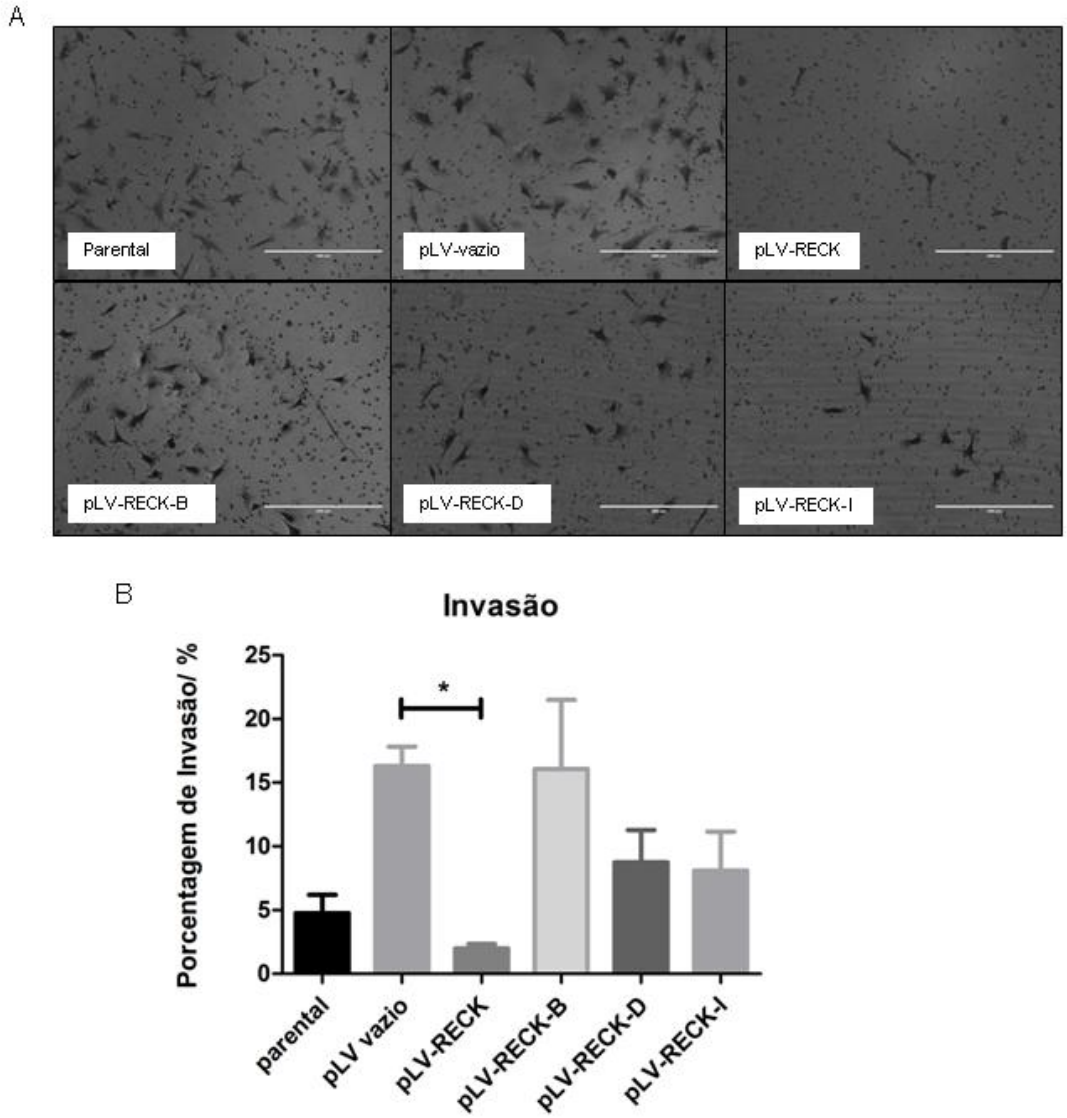


Figura 4.2.4.4.: Análise da capacidade de invasão de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK. A - Após 24h, as células presentes na porção inferior dos insertos foram fixadas, coradas e documentada. Fotos representativas são mostradas para cada linhagem. B – Quantificação dos resultados, apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

Observa-se que a expressão de *RECK* canônico inibe a capacidade invasiva de células de U87 MG, corroborando dados da literatura que mostram que a superexpressão de RECK diminui a capacidade invasiva de células T98G de GBM humano (Silveira Correa, Massaro *et al.,* 2010). Nenhuma das isoformas de *splicing*

alternativo de RECK apresenta o mesmo efeito, concluindo-se que não possuem influência sobre este processo. É interessante observar que a presençaa do vetor pLV vazio por si só aumenta o potencial invasivo das células por mecanismo não conhecido.

4.2.4.5. Análise da expressão de *MMPs* e *TIMPs* nas linhagens superexpressando as isoformas de RECK

A influência da proteína RECK canônica no processo de invasão celular está diretamente ligada à sua ação inibitória de MMPs. Os resultados aqui apresentados indicam que, apesar das isoformas alternativas apresentarem homologia à isoforma canônica, não mostram a mesma influência sobre esse processo. Dessa maneira, a expressão das *MMP-2, -9* e *-14*, que são alvos da inibição de RECK, foram investigadas nas linhagens superexpressando as isoformas deste transcrito.

Os resultados, apresentados na Figura 4.2.4.5.1. mostram que a expressão de *MMP-9* não é modulada frente à expressão das diferentes isoformas de RECK, Enquanto *MMP-2* e *MMP-14,* surpreendentemente, possuem maior expressão nas células superexpressando a variante canônica de RECK, possivelmente através de um mecanismo de retroalimentação.

Analisou-se, também, a expressão dos inibidores endógenos de MMPs, *TIMP-2* e *-3*, que apresentam uma correlação positiva entre sua expressão e aquela do transcrito canônico de *RECK* em pacientes com astrocitomas, como já discutido. A Figura 4.2.4.5.2.mostra que células superexpressando RECK canônico apresentam maior expressão de *TIMP-2*, porém a expressão de *TIMP-3* não é modulada frente à expressão das isoformas de RECK.

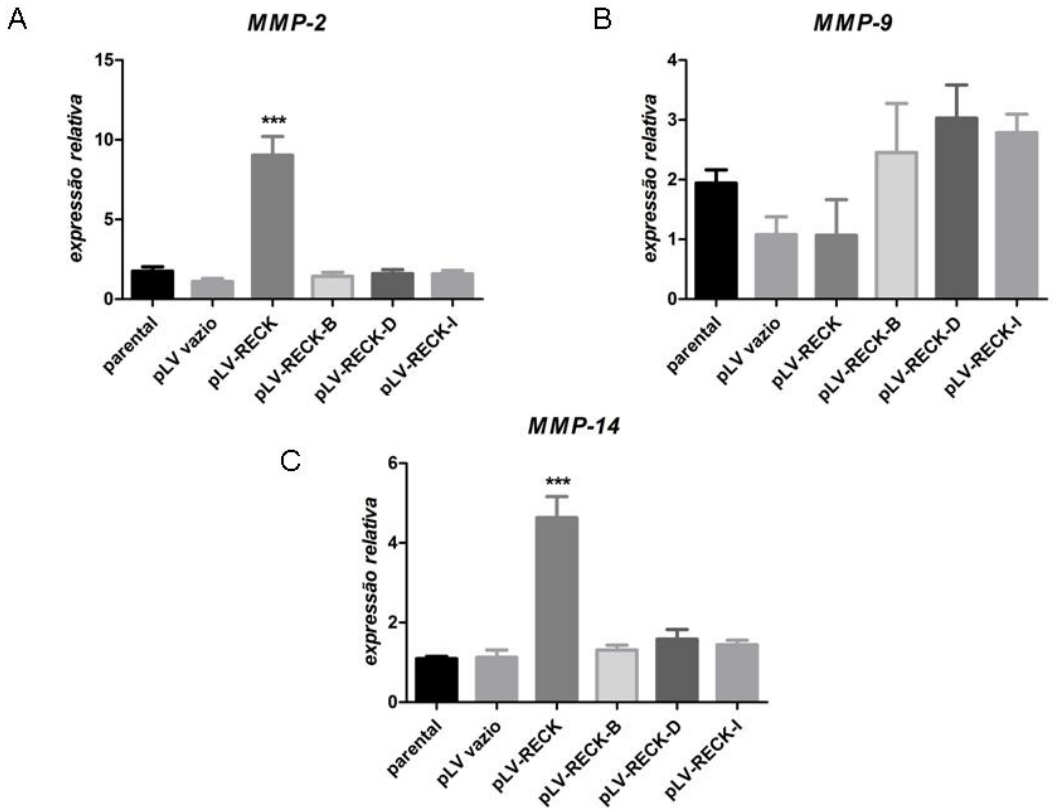


Figura 4.2.4.5.1.: Expressão relativa de MMP-2, -9 e -14 nas linhagens superexpressando as isoformas de *RECK*. Expressão relativa avaliada por qRT-PCR. A – *MMP-2*; B – *MMP-9*; e C – *MMP-14.* O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de *HPRT, HMBS* e *GAPDH*, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes.

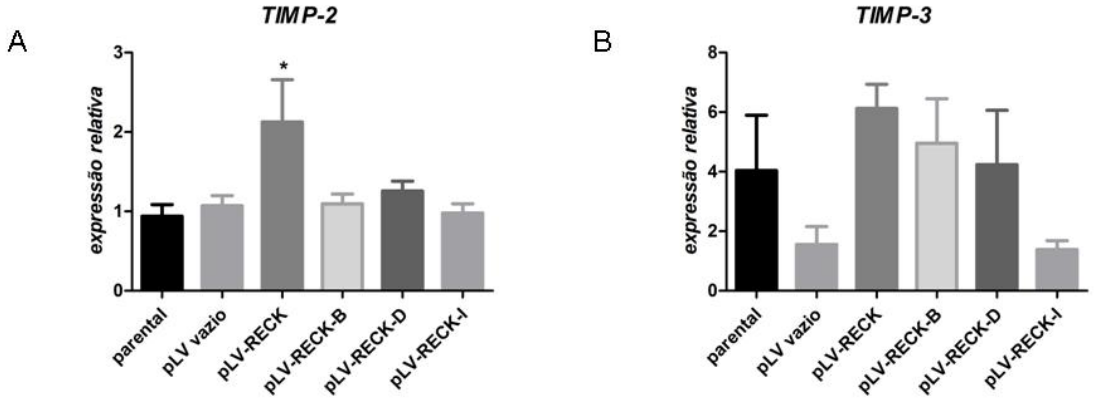


Figura 4.2.4.5.2.: Expressão relativa de TIMP-2, e -3 nas linhagens superexpressando as isoformas de *RECK*. Expressão relativa estabelecida por qRT-PCR. A – *TIMP-2*; B – *TIMP-3.* O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de *HPRT, HMBS* e *GAPDH*, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes.

4.2.4.6. Análise da atividade de MMP-2 e -9 nas linhagens superexpressando as isoformas de RECK

Além da análise da expressão de mRNA de *MMP-2* e *-9*, a atividade proteolítica dessas enzimas foi analisada nas células U87 MG superexpressando cada uma das isoformas de RECK através de ensaios de zimografia. O meio condicionado livre de soro de cada uma das linhagens foi coletado e resolvido através de eletroforese, em condições não denaturantes, em gel constituído de poliacrilamida 8% e gelatina. Ao final da eletroforese, o gel é incubado em solução contendo íons Zn^{2+}, que funcionam como cofator para a atividade das MMPs, a 37°C de modo a favorecer a degradação da gelatina pelas MMPs.

O resultado aqui apresentado é preliminar, sendo constituído de dois experimentos independentes. A banda referente à atividade de MMP-9 não foi

detectada em nenhuma das condições experimentais. A Figura 4.2.4.6. mostra que MMP-2 (72 kDa) apresenta uma tendência de maior atividade em células superexpressando RECK-B, o que ainda deve ser confirmado, porém MMP-2 não apresenta modulação de sua atividade frente à superexpressão da isoforma canônica, RECK-B ou –I.

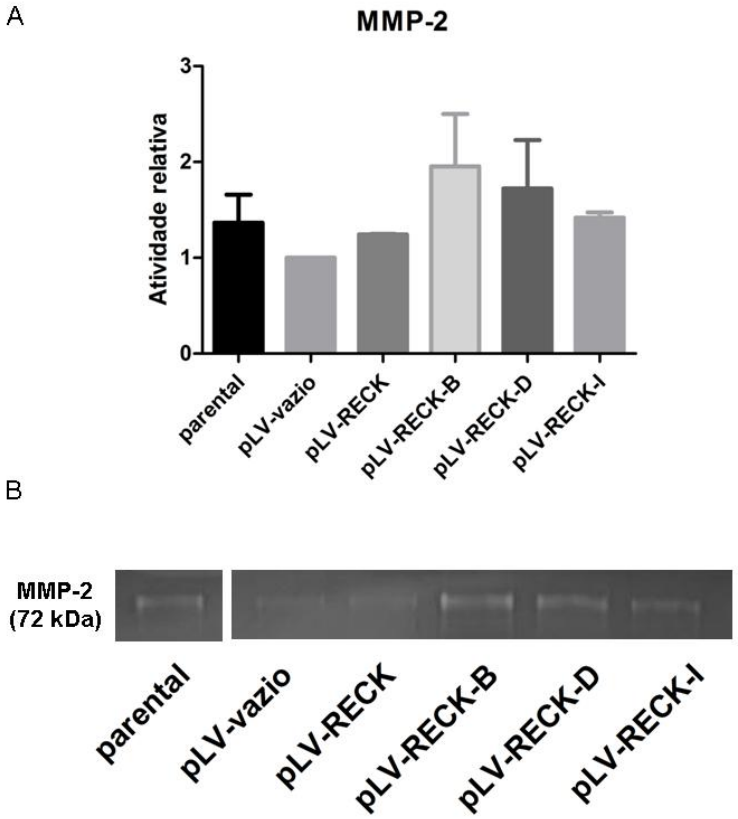


Figura 4.2.4.6.: Atividade relativa de MMP-2. Atividade relativa de MMP-2 determinada através de ensaios de zimografia. A – Quantificação do ensaio, as bandas referentes à atividade de MMP-2 foram submetidas à densitometria com auxílio do programa ImageJ, os valores obtidos foram normalizados pelo número de células e, posteriormente, pelo valor referente à U87 pLV-vazio. B- Imagem representativa do gel de zimografia.

4.2.4.7. Análise da capacidade de crescimento clonogênico das linhagens superexpressando as isoformas de RECK

A proteína RECK canônica foi primeiramente descrita por reverter o fénotipo de células NIH 3T3 transformadas com o oncogene *v-K-ras* de maligno para normal e, desde então, sua expressão tem sido associada à menor agressividade tumoral (Takahashi, 1998) (Oh, 2001). Nesse contexto, para avaliar a influência das diferentes variantes de RECK na capacidade tumorigênica, as células superexpressando cada uma das isoformas de RECK, assim como os controles, foram submetidas a ensaios de crescimento em suspensão de agarose e acompanhadas por 20 dias (Figura 4.2.4.7.).

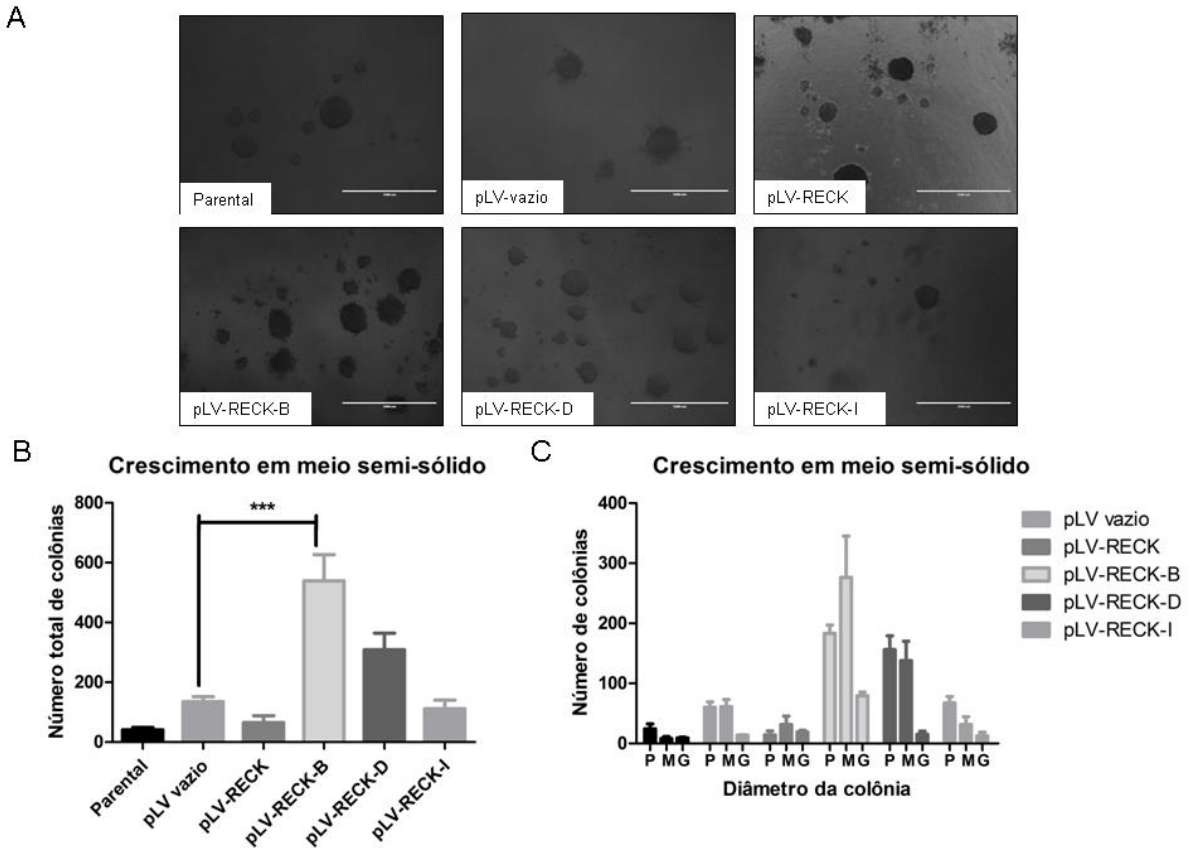


Figura 4.2.4.7.: Análise da capacidade tumorigênica de células U87 MG superexpressando as isoformas de RECK. A – Fotos representativas referentes à

cada linhagem celular ao final do experimento. B – Quantificação do número total de colônias ao final do experimento. C – As colônias foram subdivididas de acordo com seu tamanho em: pequenas (P), com diâmetro menor que 250 μm; médias (M) com diâmtro entre 250 e 500 μm; e grandes (G) com diâmetro maiores que 500 μm. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer. p representa $p < 0,001$.

Pode-se observar que células U87 MG superexpressando RECK-B dão origem a um número significativamente maior de colônias quando comparadas ao controle de células transduzidas com o vetor vazio, indicando que esta linhagem apresenta maior potencial tumorigênico. Células superexpressando RECK-D apresentam uma tendência de originarem um número maior de colônias. RECK e RECK-I aparentemente não influênciam a capacidade tumorigênica das células.

4.3. Perfil de expressão das variantes de *RECK* durante os processos de diferenciação osteogência e adipogênica

RECK canônica é uma proteína multifuncional cuja relevância não se limita a modelos patogênicos. Camundongos nos quais *RECK* funcional está ausente morrem em torno do décimo dia da fase embrionária, com deficiências de fibras colágeno, desorganização da lâmina basal e comprometimento do desenvolvimento vascular (Oh, Takahashi, *et al*., 2001). Foi descrita a modulação da expressão de RECK em diferentes modelos de diferenciação como neurogênese, condrogênese e osteogênese (Kondo, Shukunami *et al.,* 2007) (Park, Lee *et al.,* 2013)(Zambuzzi, Yano *et al.,* 2009).

Para verificar se as variantes de *RECK* descritas por esse trabalho teriam

relevância em modelos não tumorais, abrindo novas perspectivas para seu estudo, o perfil de expressão destes transcritos foi determinado em dois modelos de diferenciação, ou seja, diferenciação de células mesenquimais humanas em osteoblastos e adipócitos.

Como modelo, foram utilizadas linhagens de cultura primária de células-tronco dermais de pele humana isoladas e caracterizadas pela Dra. Maria Fernanda Forni, denominadas HU-2, HU-4 e HU-5 (Forni, 2003). Estas células apresentam perfil CD14, CD31, CD34 e CD45 negativo e CD29, CD44, CD90 e CD105 positivo, que é típico de células-tronco mesenquimais. As três culturas primárias utilizadas tiveram seu potencial de autorenovação e diferenciação em osteoblastos e adipócitos validados e caracterizados na tese de doutorado da Dra. Maria Fernanda Forni (Forni, 2003).

4.3.1. Perfil de expressão de *MMPs, TIMPs* e variantes de *RECK* durante o processo de diferenciação osteogênica

Células HU-2, HU-4 e HU-5 foram expostas a meio indutor de osteogênese por diferentes períodos de tempo (7, 14 e 21 dias) quando seu RNA foi extraído. No protocolo de diferenciação utilizado, a coleta em 7 dias corresponde à estágios iniciais de diferenciação, enquanto a de 14 dias corresponde ao estágio de comprometimento definitivo das células à diferenciação osteogênica e o período de 21 dias corresponde aos estágios tardios de diferenciação e maturação de osteoblastos. As amostras foram obtidas em colaboração com a Dra. Maria Fernanda Forni, a diferenciação osteogênica foi validada por seu perfil de alterações morfológicas nas células, presença de calcificação (por coloração de vermelho de

alizarina) e expressão de *fosfatase alcalina*, os resultados estão descritos em Forni, 2013.

O remodelamento da MEC neste processo é crucial. Mizutani e colaboradores observaram que durante a osteogênese induzida por ascorbato 2-fosfato, a expressão de *MMP-14* é maior em estágios iniciais da diferenciação e a expressão de *MMP-2* é constitutiva apesar de ter sido observado o acúmulo de MMP-2 e -9 latentes (Mizutani, Sugiyama *et al*., 2001). Panagakos & Kumas descreveram que a diferenciação de uma linhagem pré–osteoblástica leva a um aumento da expressão de *MMP-2* e *-9* enquanto *TIMP-1* não é modulado (Panagakos & Kumas, 1995).

O perfil de expressão de mRNA das *MMPs* alvos da inibição de RECK canônico, *MMP-2,-9* e *-14*, foi determinado ao longo do protocolo de diferenciação (Figura 4.3.1.1). Observa-se que todas as MMPs analisadas apresentam uma tendência a apresentar um perfil de diminuição de sua expressão ao longo da progressão da diferenciação, porém essa modulação só é expressiva em relação a MMP-9.

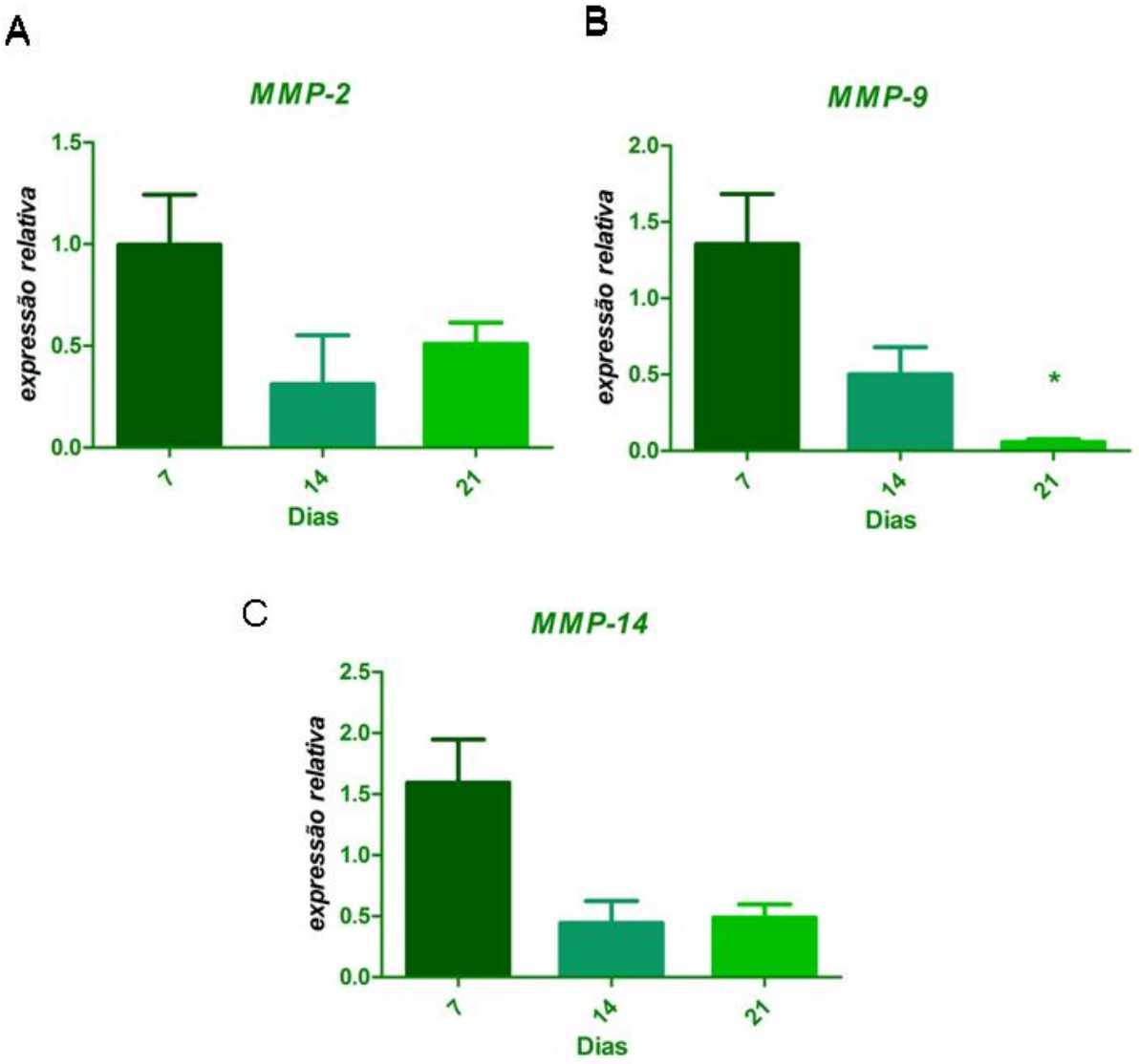


Figura 4.3.1.1: Perfil de expressão de MMPs durante o processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de osteogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias. os valores de expressão relativa de *MMP-2* (A), *MMP-9* (B), e *MMP-14* (C) foi determinada através de qRT-PCR. Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, sendo dois experimentos independentes para cada uma cada. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

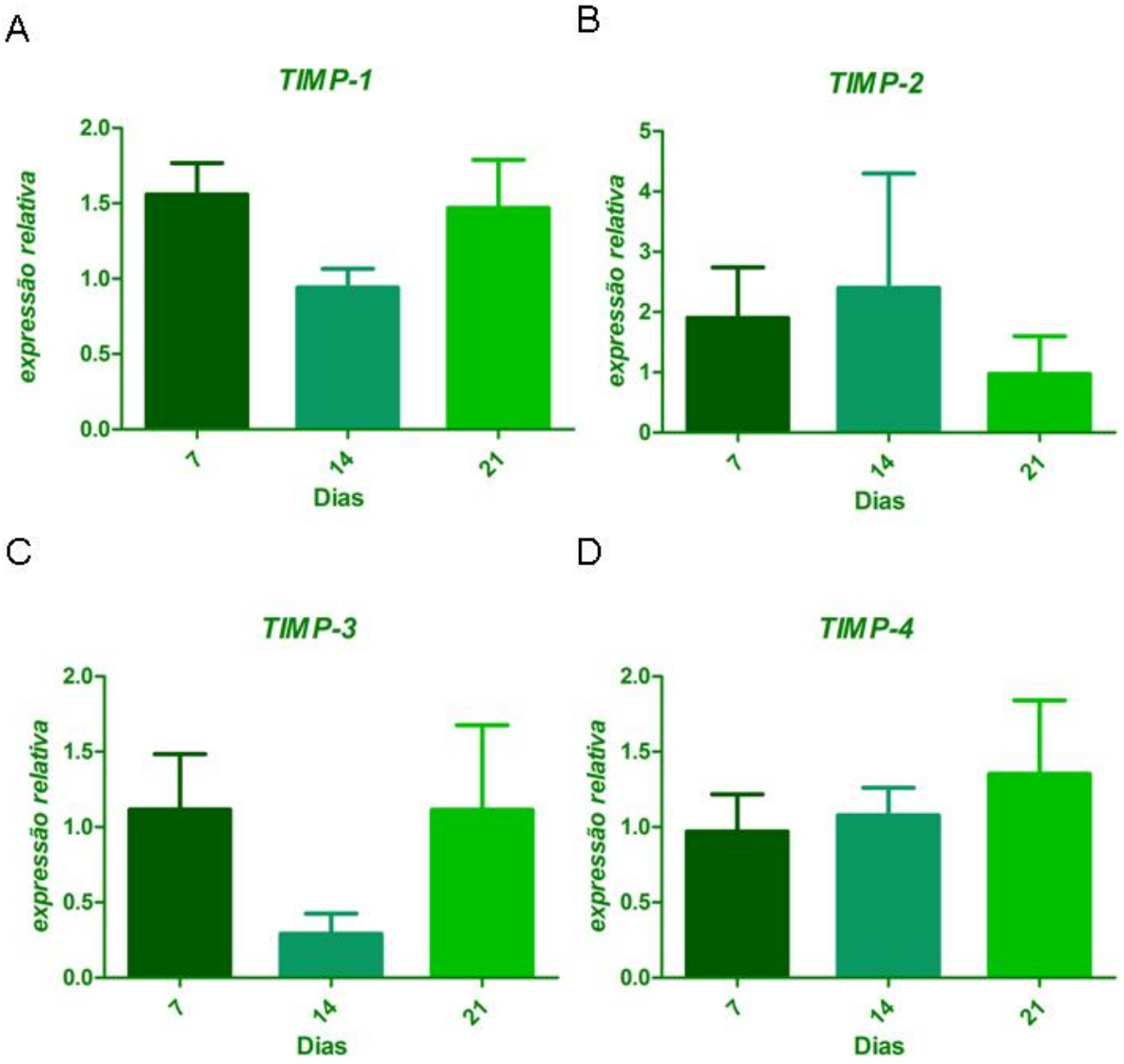


Figura 4.3.1.2: Perfil de expressão de TIMPs durante o processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de osteogênese por diferentes períodos de tempo de 7, 14 e 21 dias. Os níveis de expressão relativa de *TIMP-1* (A), *TIMP-2* (B), *TIMP-3* (C), e *TIMP-4* (D) foram determinados através de qRT-PCR. Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, sendo dois experimentos independentes cada. Os dados estão apresentados como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

Analisou-se também o perfil de expressão dos inibidores endógenos de MMPs, TIMPs, durante o protocolo de indução de diferenciação osteogênica (Figura 4.3.1.2.). Os resultados indicam que não há modulação significativa da expressão destes genes no protocolo analisado, porém *TIMP-1* e *-3* apresentam uma tendência a apresentar um vale de expressão no dia 14 do protocolo.

Por fim, estabeleceu-se o perfil de expressão das variantes de RECK durante o processo de diferenciação osteogênica (Figura 4.3.1.3.). Já foi descrito que a expressão de *RECK* canônico é modulada durante os processos de osteogênese e remodelação óssea, estando mais expresso em estágios iniciais de diferenciação (Zambuzzi, Yano *et al*., 2009). Os resultados da Figura 4.3.1.3. indicam que a expressão de RECK canônico tem uma tendência a diminuir em estágios mais tardios do protocolo, apesar de não apresentar significância estatística, corroborando os resultados da literatura. Porém, os transcritos alternativos de RECK aparentemente não são modulados.

A análise do balanço da expressão de mRNA dos transcritos de *RECK* revela um padrão interessante (Figura 4.3.1.4.), sendo a razão da expressão de *RECK-B* por *RECK* aumentada conforme a progressão do protocolo de diferenciação, enquanto que as razões *RECK-D/RECK e RECK-I/RECK* apresentam, como tendência, um pico no dia 14 do protocolo, porém essa tendência não é estatisticamente significativa.

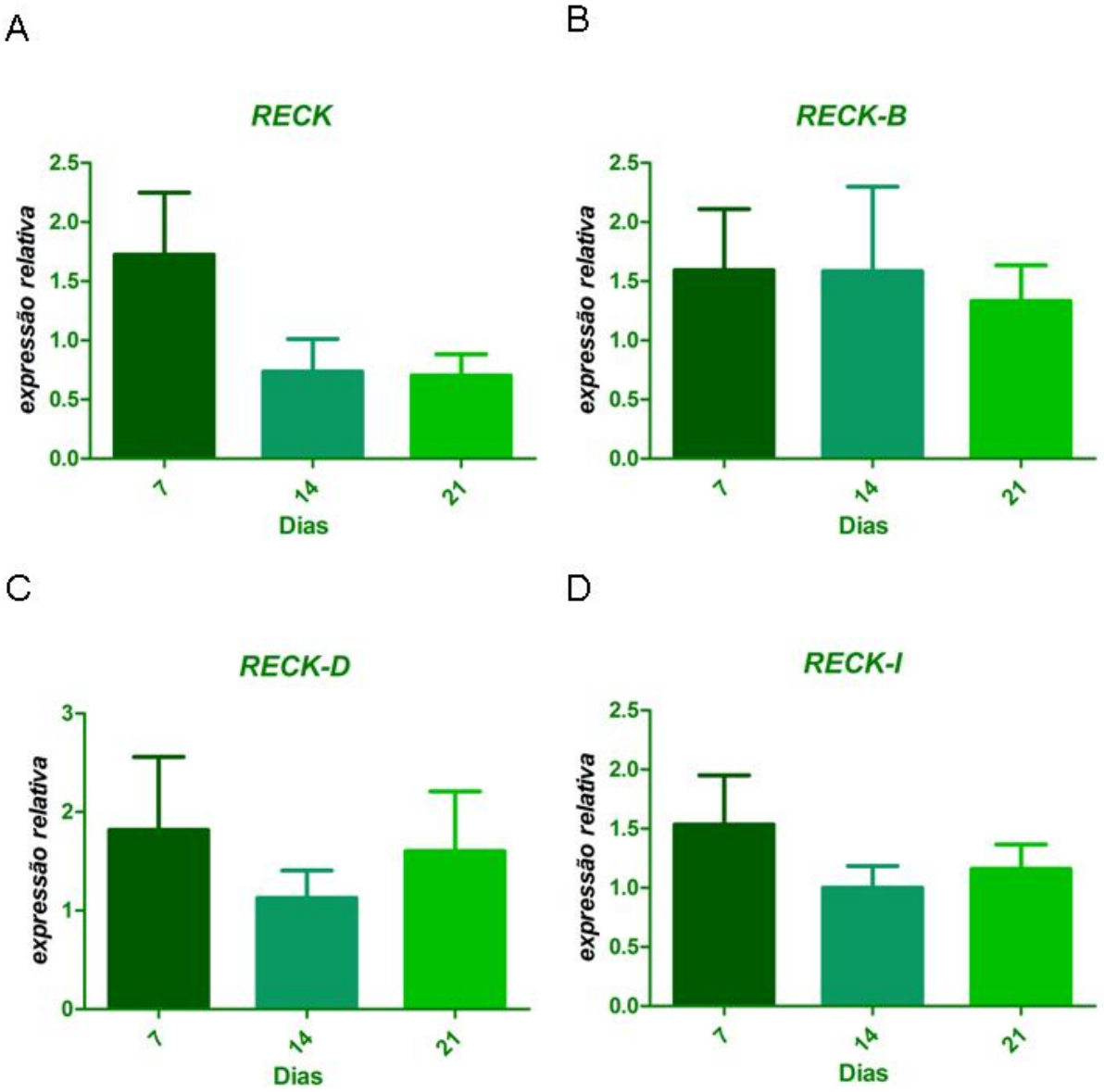


Figura 4.3.1.3.: Perfil de expressão dos transcritos de *RECK* durante o processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de osteogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias. Os valores de expressão relativa de *RECK* (A), *RECK-B* (B), *RECK-D* (C), e *RECK -I* (D) foram determinados através de qRT-PCR. Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, sendo dois experimentos independentes para cada uma. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

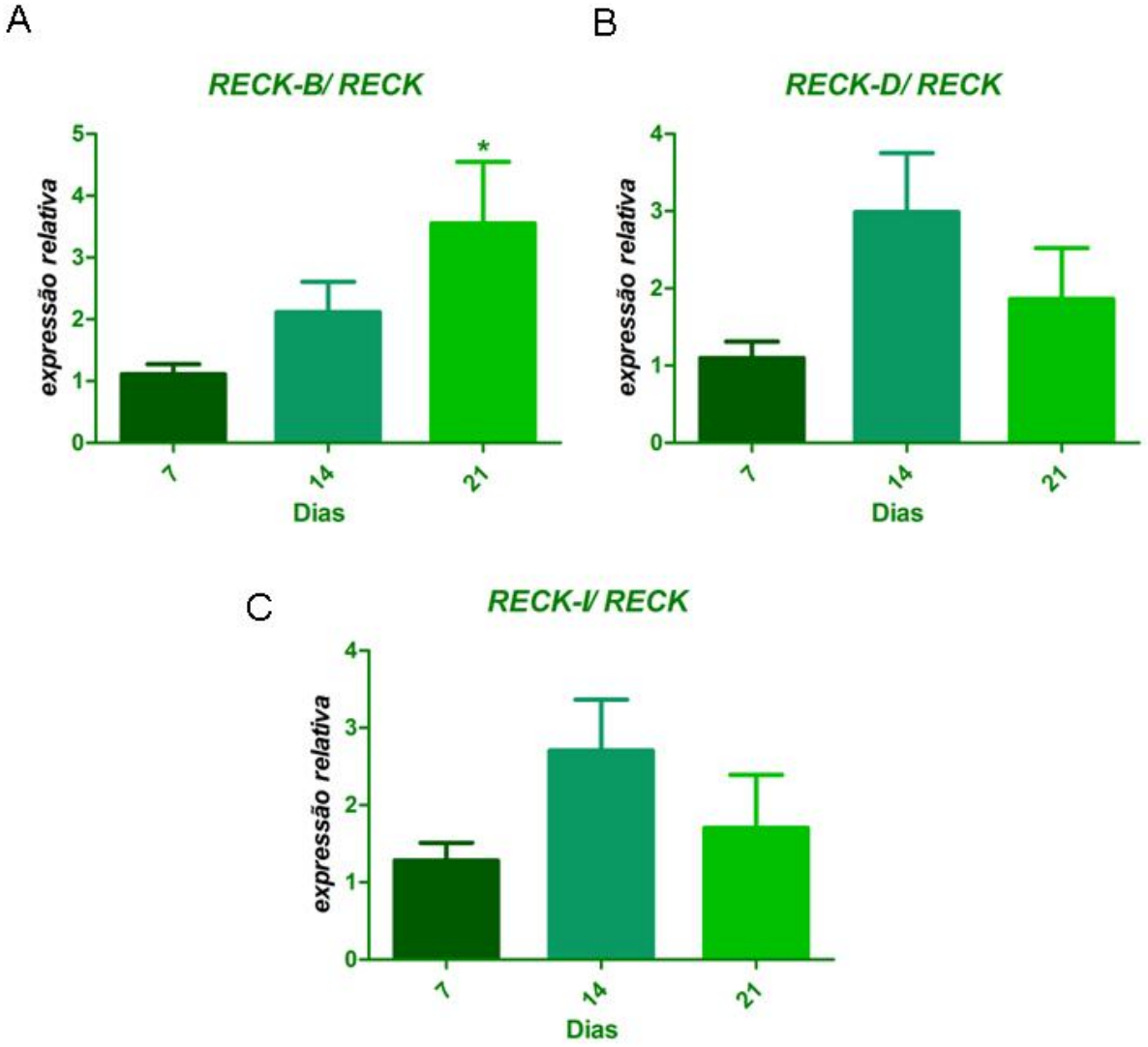


Figura 4.3.1.4.: Balanço entre os valores de expressão dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à variante canônica durante o processo de diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de osteogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias. Estão representadas as razões *RECK-B/ RECK* (A), *RECK-D/ RECK* (B) e *RECK-I/ RECK* (C). Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, sendo dois experimentos independentes para cada uma. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

4.3.2. Perfil de expressão de *MMPs, TIMPs* e variantes de *RECK* durante os processos de diferenciação adipogênica

Células HU-2, HU-4 e HU-5 foram expostas ao meio indutor de adipogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias, e seu RNA foi coletado. No protocolo de diferenciação utilizado, a coleta em 7 dias corresponde à estágios iniciais de diferenciação, a coleta em 14 dias corresponde ao estágio de comprometimento definitivo das células à diferenciação adipogênica e o período de 21 dias corresponde aos estágios tardios de diferenciação e maturação de adipócitos. As amostras foram obtidas em colaboração com a Dra. Maria Fernanda Forni, com a diferenciação adipogênica sendo validada por seu perfil de alterações morfológicas das células, presença de gotículas lipídicas (por coloração de Oil Red O) e expressão de *leptina*. Os resultados estão mostrados e descritos em Forni, 2013.

Assim como no caso da diferenciação osteogênica, durante a diferenciação adipogênica, o remodelamento da MEC e, portanto, a modulação da expressão de MMPs e TIMPs, é essencial. Foi descrito que a expressão de MMP-2, -9, e -14 aumentam durante a progressão do processo de adipogênese , acompanhado de um aumento na expressão de TIMP-2 (Sillat, Saat *et al*., 2012)(Bouloumie, Sengenes *et al*., 2001).

O perfil de expressão de mRNA das *MMPs* alvos da inibição de RECK canônico, *MMP-2,-9* e *-14*, foi determinado durante o protocolo analisado (Figura 4.3.2.1). Observa-se que o perfil de expressão de MMP-2 e -14 apresenta uma tendência de aumento conforme a progressão do protocolo de diferenciação, apesar de não apresentar significância estatística, corroborando os dados encontrados na literatura. Por outro lado, a expressão de MMP-9 apresenta uma tendência de

diminuição durante esse processo, apesar de também não apresentar significância estatística.

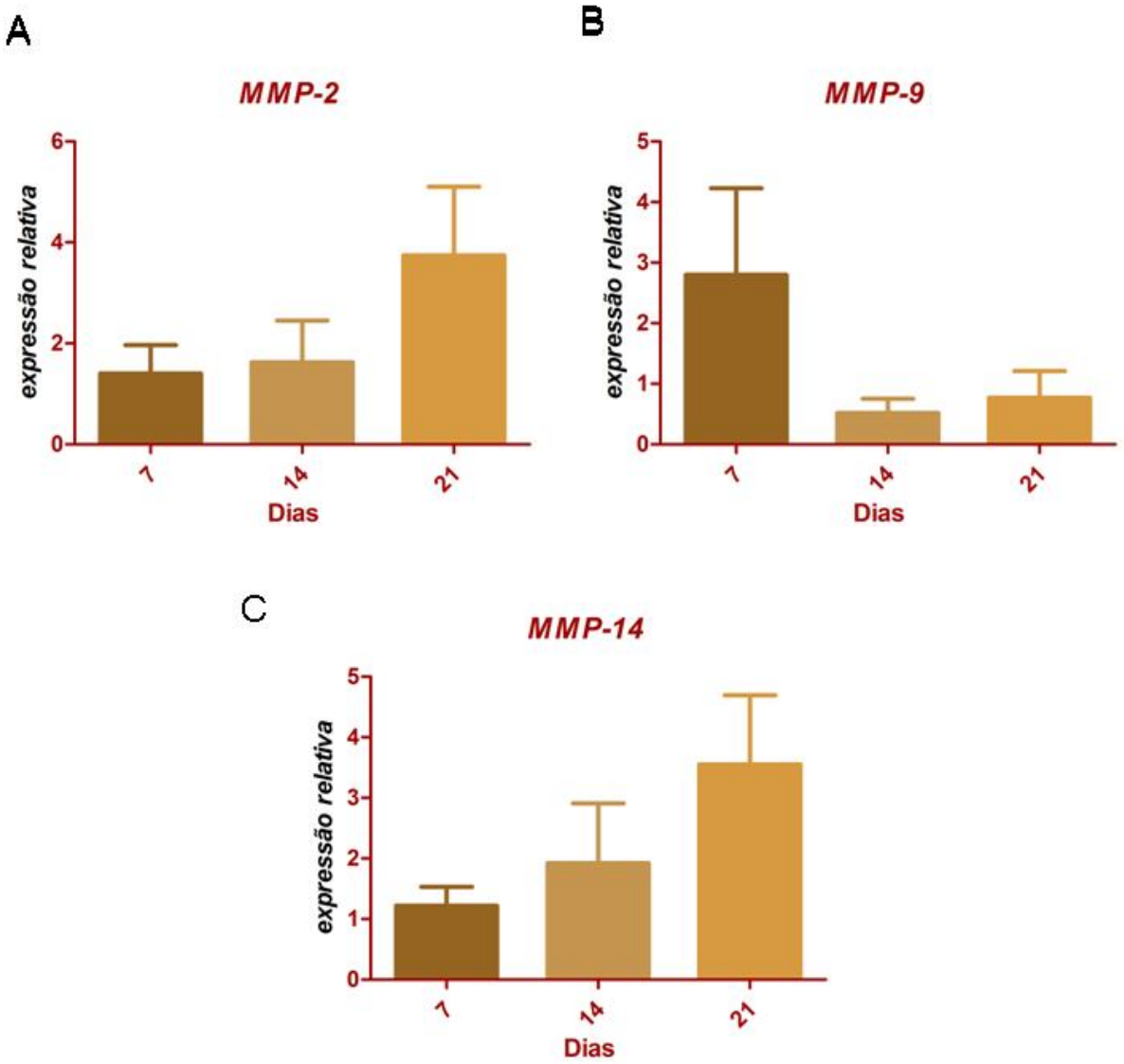


Figura 4.3.2.1: Perfil de expressão de MMPs durante o processo de diferenciação adipogênica de células tronco mesenquimais. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de adipogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias. Os valores de expressão relativa de *MMP-2* (A), *MMP-9* (B), e *MMP-14* (C) foram determinadas através de qRT-PCR. Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, sendo dois experimentos independentes para cada uma. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

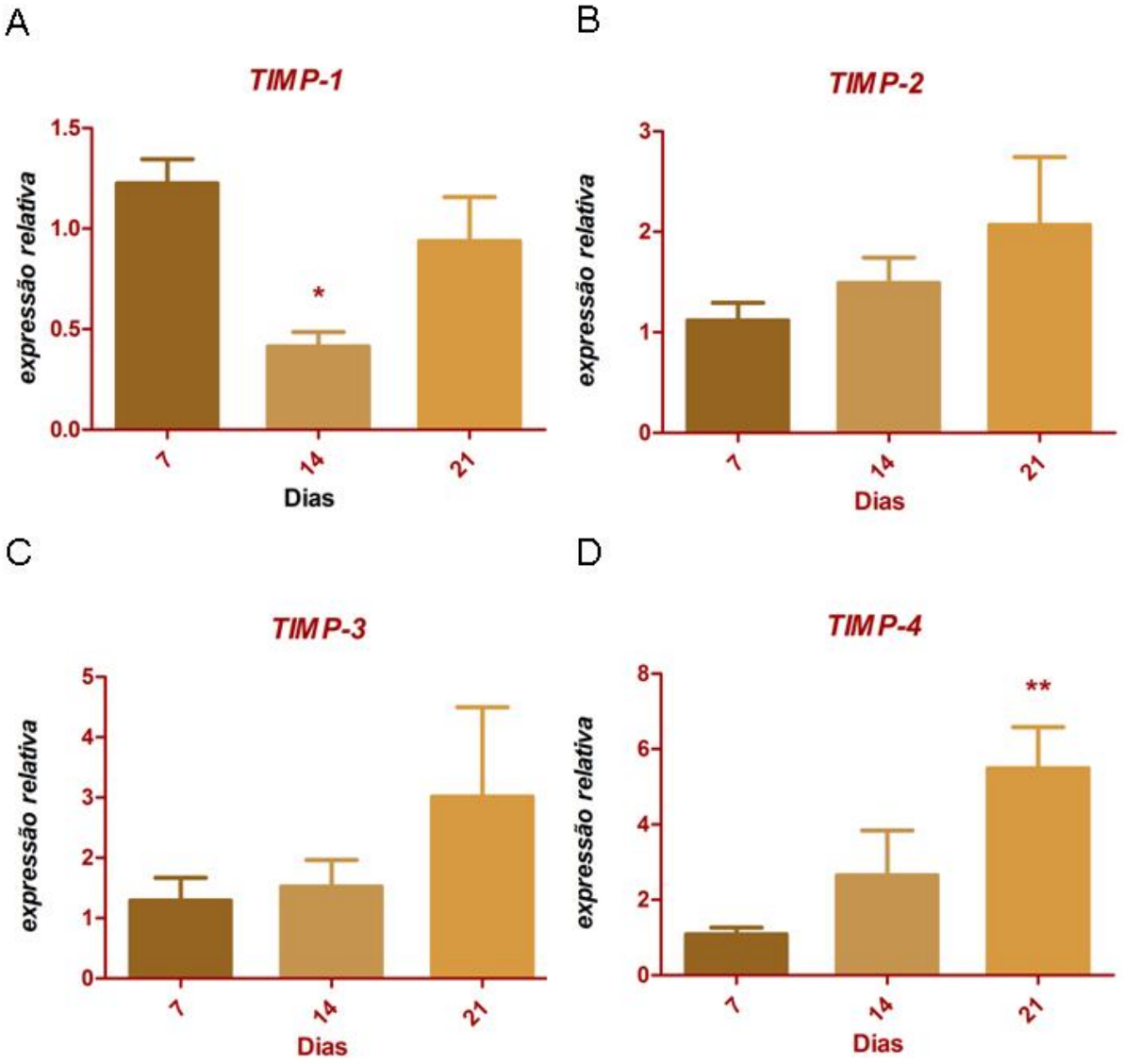


Figura 4.3.2.2: Perfil de expressão de TIMPs durante o processo de diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de adipogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias. Os valores de expressão relativa de *TIMP-1* (A), *TIMP-2* (B), *TIMP-3* (C), e *TIMP-4* (D) foram determinadas através de qRT-PCR. Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, sendo dois experimentos independentes para cada linhagem. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

Analisou-se o perfil de expressão dos inibidores endógenos de MMPs e TIMPs, durante o protocolo de indução de adipogênese (Figura 4.3.2.2.). Estes resultados indicam que *TIMP-2* e *-4*, apresentam perfil de aumento da expressão conforme a progressão do protocolo, apesar de *TIMP-2* não apresentar significância estatística. *TIMP-1* apresenta uma queda de expressão no dia 14 do protocolo e *TIMP-3* aparentemente não é modulado neste modelo.

Por fim, estabeleceu-se o perfil de expressão das variantes de RECK durante o processo de diferenciação osteogênica (Figura 4.3.2.3.). Os resultados indicam que *RECK* canônico tem sua expressão de mRNA aumentada em estágios mais tardios do protocolo. *RECK- B* e *–D*, apresentam uma tendência a ter um pico de expressão no dia 14 do protocolo, apesar de não apresentarem significância estatística, e RECK-I aparentemente não é modulado neste modelo. Como durante a osteogênese, a análise do balanço da expressão de mRNA dos transcritos de *RECK* revela um padrão interessante (Figura 4.3.2.4.). A razão entre a expressão do mRNA do transcrito canônico em relação aos seus transcritos alternativos aumenta conforme a progressão do protocolo, sendo o padrão inverso em relação àquele observado durante a osteogênese.

Assim, os resultados apresentados evidenciam a expressão diferencial dos transcritos de *RECK* durante os processos de diferenciação osteogênica e adipogênica, sendo que o balanço entre essas expressões apresenta perfil inverso nos dois processos analisados. Conclui-se que os processos de diferenciação osteogênica e adipogênica são potenciais modelos de estudo nos quais o papel dos transcritos de *RECK* e do balanço de expressão entre esses transcritos podem ser esclarecidos.

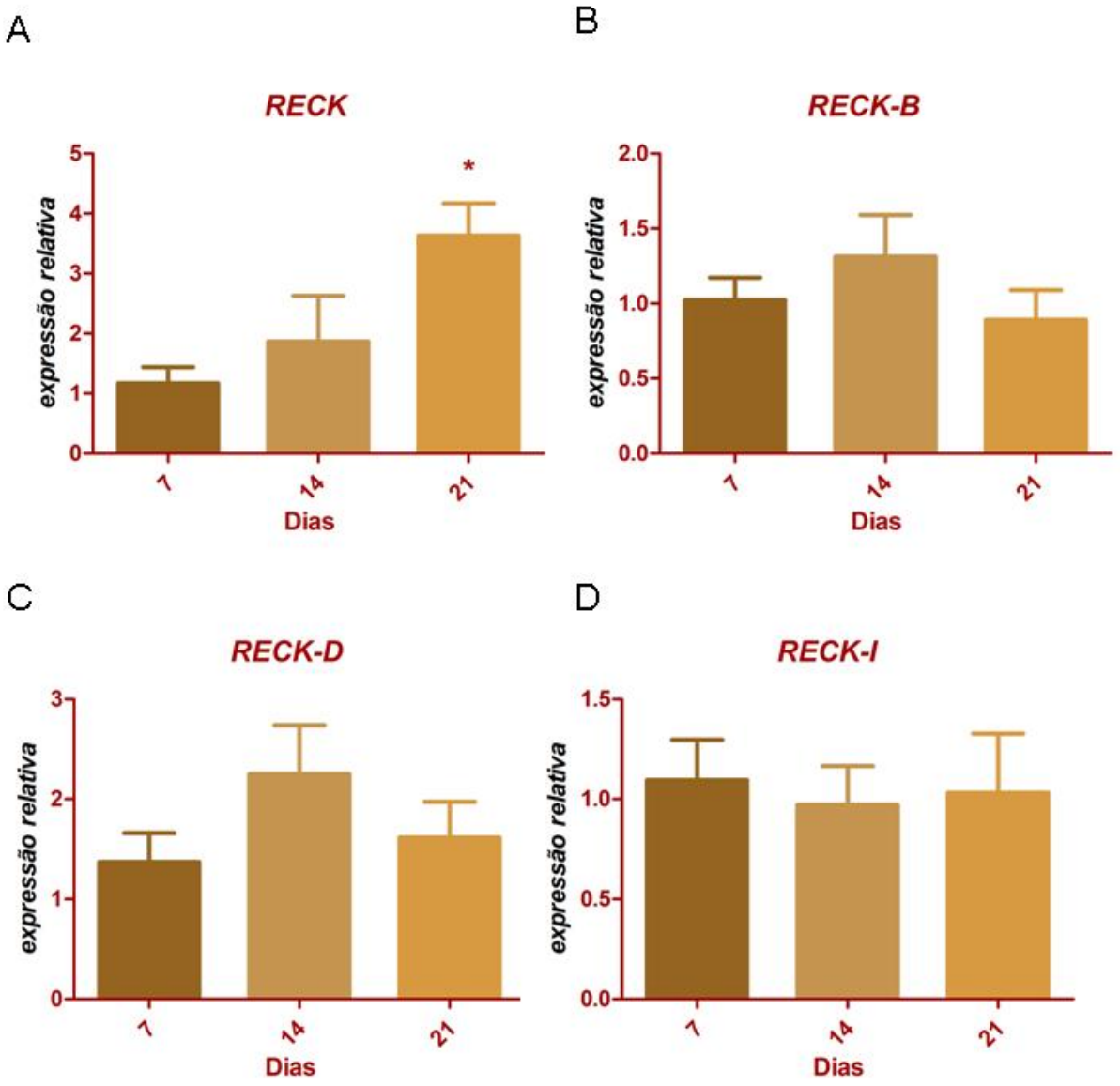


Figura 4.3.2.3.: Perfil de expressão dos transcritos de *RECK* durante o processo de diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de adipogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias. Os valores de expressão relativa de *RECK* (A), *RECK-B* (B), *RECK-D* (C), e *RECK -I* (D) foram determinados através de qRT-PCR. Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, sendo dois experimentos independentes para cada linhagem. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

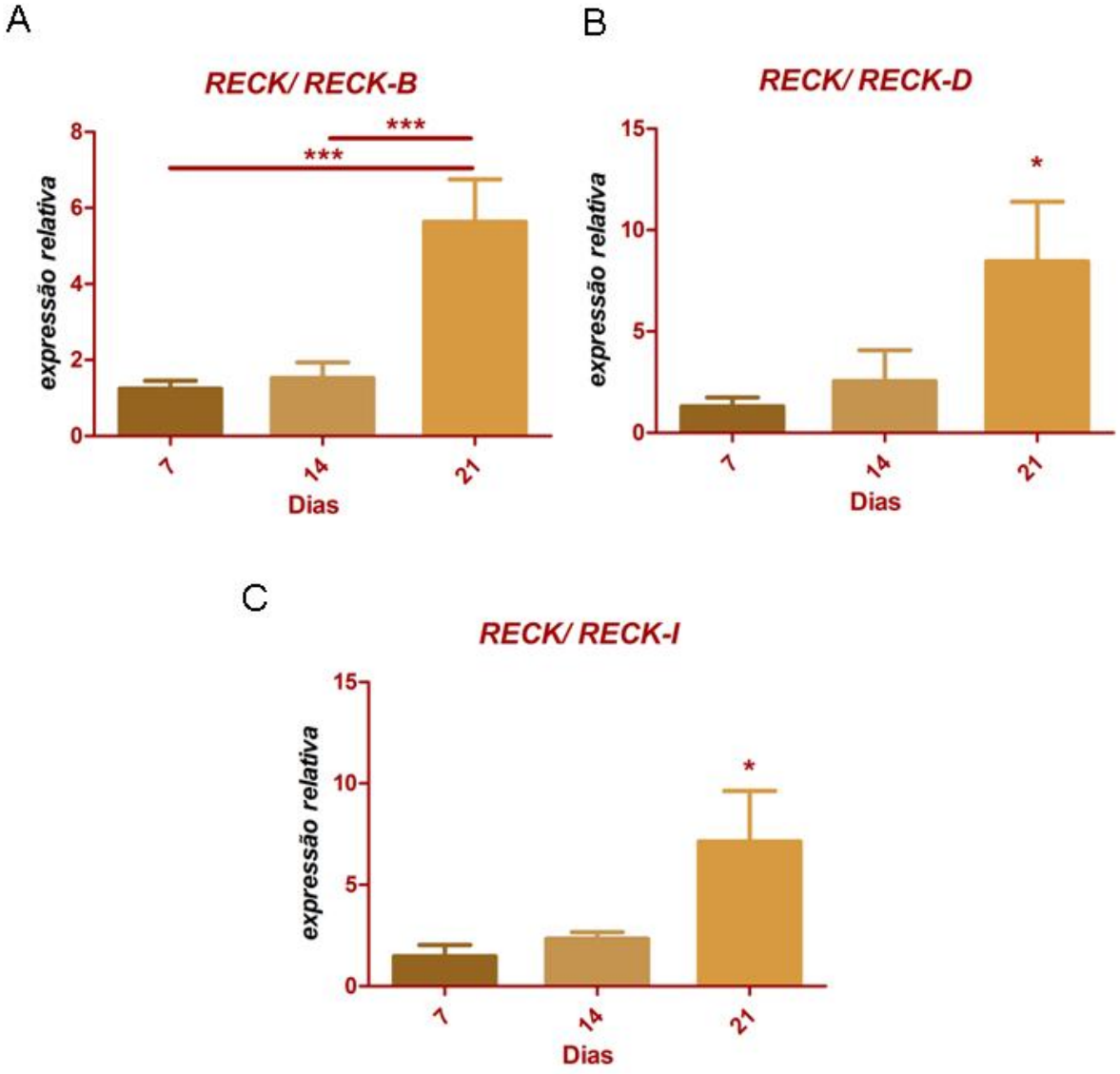


Figura 4.3.2.4.: Balanço entre os valores de expressão dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à variante canônica durante o processo de diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais. Células-tronco mesenquimais humanas foram tratadas com meio indutor de adipogênese por diferentes períodos de tempo, 7, 14 e 21 dias. Estão representadas as razões *RECK-B/ RECK* (A), *RECK-D/ RECK* (B) e *RECK-I/ RECK* (C). Foram analisados os resultados de três culturas primárias de células mesenquimais, com dois experimentos independentes cada. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA, seguido do teste a posteriori Tukey-Kramer.

5. Discussão

O gene supressor de tumor *RECK* possui, até o momento, uma única variante de *splicing* descrita na literatura. O transcrito canônico de *RECK* codifica uma proteína cujo perfil de expressão se mostra abundante em diversos tecidos normais e escasso, ou não detectável, em linhagens derivadas de tumor ou transformadas com diferentes oncogenes (Takahashi, Sheng et al. 1998). A expressão de RECK está associada a uma menor agressividade tumoral, acreditando-se que isso se deve principalmente à sua atividade como inibidor de proteases que degradam a MEC. A maior expressão de RECK resulta em uma menor capacidade invasiva das células tumorais, suprimindo assim a progressão tumoral (Oh J 2001) (Takahashi, Sheng et al. 1998).

RECK se destaca por apresentar valor prognóstico em diferentes tipos tumorais (Furumoto, Arii et al. 2001) (Takenaka, Ishikawa et al. 2004) (Takenaka, Ishikawa et al. 2005) (Masui, Doi et al. 2003). Porém, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente claro e, em alguns modelos, este gene possui um padrão de expressão contrário ao esperado. Em carcinomas mamários, a expressão de *RECK* aumenta com a progressão tumoral, sendo considerada como marcador de pior prognóstico (Figueira, Gomes et al. 2009) (Gomes, Terra et al. 2012).

Tendo-se em mente que o *splicing* alternativo pode gerar transcritos cujos produtos proteicos apresentam funções antagônicas dentro de uma mesma via e que diversas vias de sinalização oncogênica, como Ras/PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK/ERK, e c-Myc (revisado em (Trombetta-Lima, Jacomasso et al. 2013)), afetam o padrão de *splicing* global da célula, procurou-se, neste estudo, verificar a existência de variantes de *splicing* correspondentes ao gene supressor de tumor *RECK* e avaliar sua influência em

processos nos quais a isoforma canônica de RECK está envolvida.

5.1. Identificação das variantes de *splicing* alternativo do gene supressor de tumor RECK

O gene RECK humano está localizado no cromossomo 9p13, e recobre mais de 87 kb do genoma humano (Eisenberg, Hochner et al. 2002). Atualmente, uma única variante de *RECK* é descrita na literatura, consistindo de 21 exons e 20 introns (Eisenberg, Hochner et al. 2002).

Foram analisadas ESTs depositadas no GenBank que são homólogas à sequência de *RECK* em busca de variantes de *splicing* alternativo desse gene. Após uma varredura inicial, focou-se na análise de transcritos resultantes da seleção de sítios aceptores de *splicing* alternativos na fronteira intron 8/ exon 9, por apresentarem, na época da análise duas sequências de mRNA não-referências que refletiam a seleção alternativa desse sitio, GenbankCR593801.1. eBC060806.1. Adicionou-se à esta análise o estudo de um terceiro sitio aceptor alternativo na mesma região, o qual foi evidenciado na EST GenbankBU599106. As variantes de *splicing* identificadas foram denominadas: *RECK-B* (homóloga à sequência não-referência GenbankCR593801.1), *RECK-D* (homóloga à sequência não-referência GenbankBC060806.1), e *RECK-I* (homóloga à EST GenbankBU599106).

Em contraste com os 21 exons presentes no transcrito canônico de RECK, cada uma das três variantes de *splicing* descritas contem nove exons. Os transcritos estudados compartilham os oito primeiros exons com o transcrito de *RECK* canônico, porém, o nono exon é diferente do nono exon do transcrito canônico, sendo distinto,

também, entre as variantes.

É interessante notar que as ferramentas de reconhecimento de sítios de *splicing* HSF e ExonScan falharam em prever os sítios aceptores de *splicing* alternativos na fronteira intron 8/ exon 9 utilizados no processamento que origina *RECK-B* e *RECK-D,* sendo que somente a ferramenta HSF previu o sítio aceptor de *splicing* alternativo utilizado no processamento que origina *RECK-I*. A ferramenta HSF utiliza, em sua previsão, o cálculo de matrizes MaxEnt, que é o mesmo princípio do algoritmo utilizado pela ferramenta ExonScan (Desmet, Hamroun et al. 2009) (Yeo, Srinivasan et al. 2004). O cálculo de matrizes MaxEnt utiliza o princípio de máxima entropia e leva em consideração a identidade das sequências dos sítios de *splicing* em si e considera, também, a influência de regiões *cis* mais distantes, num raio de 200 nt, indicando que os sítios aceptores de *splicing* selecionados durante o processamento do RNA que origina as variantes de *RECK,* são numa primeira análise, considerados fracos, portanto, de modo que um mecanismo de seleção fino no processamento do gene *RECK* provavelmente deve ocorrer.

5.2. Expressão das isoformas proteicas de RECK

Todos os transcritos identificados codificam proteínas, cujos cDNAs correspondentes foram clonados e expressos em modelo de células 293T ou 293-S: RECK-B (248 aa, 40 kDa), RECK-D (225 aa, 36kDa, GenBank ID AAH60806), e RECK-I (220 aa, 30kDa). Conforme suas sequências primárias previstas, todas as variantes de RECK apresentariam os 213 aa iniciais de sua porção N-terminal em comum e teriam porções C-terminais únicas. As variantes de RECK não possuem os domínios SP1

presentes na forma canônica, cujo envolvimento no potencial de inibição da atividade de MMP-9 por RECK canônico foi descrito (Fairbrother, Yeh et al. 2002), sugerindo que RECK-B, -D e –I não seriam capazes de inibir a atividade de MMP-9.

RECK-B é possivelmente ancorada à membrana plasmática através de uma âncora GPI, como a isoforma canônica de RECK, assim, é possível que essas duas isoformas co-localizem na membrana celular. Infere-se que a proteína RECK canônica esteja ancorada à membrana plasmática em forma de dímeros, nos quais os monômeros estariam ligados por ligações dissulfeto (Omura, Matsuzaki et al. 2009). Apesar das regiões de interação entre os monômeros de RECK não serem ainda conhecidas, a homologia das porções N-terminais das isoformas de RECK compreende sua região rica em cisteína, e, caso a região responsável pela formação dos dímeros envolva essa porção comum às duas isoformas, existe a possibilidade da formação de heterodímeros entre RECK canônico e RECK-B, além da formação de dímeros de RECK-B, que poderiam alterar a função de RECK canônico, talvez atuando como um dominante negativo, ou apresentar atividade e alvos de interação diferentes do homodímero canônico, resultando em uma função distinta e até antagônica quando comparado ao homodímero canônico.

Todas as isoformas expressas secretadas, apresentam uma massa de aproximadamente 12 kDa a mais em relação àquela prevista. A análise das sequências primárias das isoformas pela ferramenta PROSITE revela que todas possuem cinco sítios de N-gliocosilação potenciais, além de múltiplos sítios de fosforilação na porção comum às três isoformas. Tais modificações pós-traducionais poderiam explicar a diferença entre a massa predita e a observada. RECK-B foi a única isoforma caracterizada cuja expressão foi detectada tanto no meio condicionado de células

superexpressoras quanto no extrato celular, sendo que a proteína presente no extrato celular apresenta massa similar ao valor predito de 27 kDa. Essa detecção pode corresponder à proteína em processamento ou ancorada à membrana plasmática.

A purificação e o sequenciamento das proteínas expressas está em andamento para melhor caracterização das isoformas de RECK.

5.3. Perfil de expressão dos transcritos de *RECK* em painel de RNA de tecidos normais

A análise da expressão dos transcritos alternativos de *RECK* por qRT-PCR em um painel de tecidos humanos normais mostra que essas variantes são expressas em uma grande variedade de tecidos humanos e apresentam diferentes níveis de expressão relativa de mRNA em comparação à variante canônica, assim como entre as especificas variantes alternativas. Isto demonstra que, apesar das três variantes descritas apresentarem sítios aceptores de *splicing* envolvidos na junção exon 8 /exon 9 aparentemente fracos, esses transcritos são de fato expressos em diferentes condições.

Foi previamente descrito que a variante canônica de RECK possui um papel importante durante a neurogênese no desenvolvimento do tecido do córtex cerebral em camundongos através da regulação da via de Notch (Muraguchi T 2007). Os resultados aqui apresentados mostram que o balanço de expressão das três variantes descritas, em relação a variante canônica, é maior em cérebro fetal, quando comparado ao tecido adulto, sugerindo que o balanço de expressão entre os transcritos de *RECK* pode possuir um papel importante durante a embriogênese humana deste tecido.

5.4. As variantes de *splicing* de *RECK* e seu envolvimento na biologia de astrocitomas

O envolvimento das MMPs na progressão de astrocitomas são amplamente descritos na literatura, assim como o uso de MMPs e seus inibidores no diagnóstico desses tumores (Gabelloni, Da Pozzo et al.) (Brell, Ibanez et al.) (Itoh and Nagase 2002). Sabendo que a expressão de RECK canônico está envolvida com o potencial invasivo de linhagens T98G de glioblastoma humano (Silveira Correa, Massaro et al. 2010), nesta parte do estudo, propôs-se avaliar a influência das variantes geradas por *splicing* alternativo do gene supressor de tumor e metástase *RECK* na agressividade de glioblastomas e seu potencial como marcadores prognósticos. Vale ressaltar que eventos de *splicing* alternativos ou aberrantes tem um papel importante no desenvolvimento de diversas patologias, inclusive o câncer. Existem fortes evidências da existência de variantes específicas de *splicing* em 316 genes humanos envolvidos no controle do ciclo celular, vias de transdução de sinal, apoptose, angiogênese, invasão, motilidade e metástase (Brinkman BM 2004) (Faustino NA 2003) (Naor D 2002) (Orban TI 2003) (Scholzová E 2007). Estes estudos descrevem mutações em elementos *cis* regulatórios e alterações na maquinaria regulatória de *splicing*, que levam a mudanças no padrão de *splicing* de diversos genes relacionados ao câncer, tais como *CD44, BRCA1, OsABIS*, e *SECISBP2* (Wang, Rolish et al. 2004) (Fairbrother, Yeh et al. 2002) (Zou M 2007) (Papp LV 2008) (Roy M 2005).

5.4.1. Perfil de expressão dos transcritos de *RECK, MMPs* e *TIMPs* durante a progressão de astrocitomas e sua correlação com a sobrevida de pacientes com GBM

Classicamente, tem sido descrito que RECK canônico está envolvido na supressão dos processos de invasão, angiogênese e metástase, em parte por sua habilidade de regular negativamente pelo menos quatro MMPs: MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-14 (Sasahara RM 2002); assim como as metaloproteinases extracelulares ADAM10 e CD13/Aminopeptidase N (Miki T 2007) (Muraguchi T).

O comportamento invasivo é uma das características chave dos astrocitomas de alto grau, o que confere bordas tumorais difusas e estabelece inúmeras micrometástases, responsáveis pela dificuldade na ressecção cirúrgica total do tumor e falha na eficácia do tratamento, sendo, o remodelamento da MEC, crucial nesse processo (Ohgaki H 2007).

O perfil de expressão das MMPs classicamente envolvidas com a função inibitória de RECK canônico, *MMP-2, -9* e *-14,* foi determinado durante a progressão de gliomas através de qRT-PCR, em amostras controle não-tumorais e em amostras tumorais de pacientes com astrocitomas graus II, III e IV, revelando que todas as MMPs analisadas apresentam maior expressão nas amostras tumorais, sendo *MMP-14* e *MMP-2* mais expressas em amostras de GBM. Estes dados corroboram aqueles da literatura (Sasahara RM 2002), sendo esperados devido ao comportamento invasivo das células de astrocitoma de alto grau frente ao parênquima normal adjacente.

Determinou-se, também, o perfil de expressão dos inibidores endógenos de MMPs, os *TIMPs*, durante a progressão de astrocitomas. Observa-se que *TIMP-1*

apresenta maior expressão em amostras de GBM, corroborando dados da literatura, sendo TIMP-1 uma molécula multifunctional caracterizada como um marcador de malignidade e de um pobre prognóstico em GBM (Polisetty, Gupta et al. 2011) (Aaberg-Jessen, Christensen et al. 2009) Aparentemente, *TIMP-2* não é modulado durante a progressão de astrocitomas (Nakada, Kita et al. 2001), corroborando dados da literatura, e *TIMP-3* apresenta leve diminuição de sua expressão durante a progressão de astrocitomas. Apesar de nenhuma modulação clara de *TIMP-3* nesse modelo ter sido descrita na literatura, foi observada a metilação de seu promotor em GBMs secundários (Groft, Muzik et al. 2001), valendo a pena ressaltar que o grupo de amostras analisado era composto tanto por tumores primários quanto secundários.

A análise da expressão dos transcritos alternativos de *RECK* durante a progressão de astrocitomas revelou que, apesar de *RECK-I* aparentemente não ser modulado durante a progressão de astrocitomas, *RECK-B* e *RECK-D* apresentam suas expressões relativas diminuídas em GBMs quando comparadas com o grupo de amostras de astrocitomas grau II, que possuem tendência natural de progredir para tumores de graus III e IV, um padrão similar àquele observado para o transcrito canônico, porém apresentando uma maior variabilidade nos valores de expressão dentro de um mesmo grupo de malignidade histopatológica.

A expressão do transcrito canônico de *RECK* correlaciona positivamente com a expressão de *TIMP-3* nessas amostras, o que também é observado em modelo de melanona (Trombetta-Lima, Jacomasso et al. 2013), o que é interessante considerando que ambos os transcritos são regulados por MiR-21 (Gabriely, Wurdinger et al. 2008). As expressões de *RECK, RECK-B* e *RECK-I*, mas não de *RECK-D*, correlacionam positivamente com a expressão de *TIMP-2*. Foi descrito que TIMP-2 induz a expressão

de *RECK* canônico (Oh, Diaz et al. 2006) (Oh, Seo et al. 2004), sugerindo um possível papel de *TIMP-2* na modulação da expressão das variantes de *RECK*. Apesar de *TIMP-2* não ser modulado durante a progressão de astrocitomas, foi descrito que uma menor expressão de TIMP-2 correlaciona com um pobre prognóstico em pacientes com GBM (Nakada, Kita et al. 2001). Por outro lado, nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão das variantes de *RECK* e a expressão de *MMP-9*, cuja expressão é modulada transcricionalmente por RECK canônico (Chang, Hung et al. 2008).

5.4.2. Correlação entre a expressão e balanço dos valores de expressão relativa dos transcritos de *RECK* e sobrevida global de pacientes com GBM

GBMs são tumores agressivos, caracterizados por apresentarem um pobre prognóstico, com sobrevida média após o diagnóstico de menos de 12 meses (Ahmadloo, Kani et al. 2013). Assim, torna-se importante a busca por biomarcadores que forneçam informações que permitam prever a resposta à terapia, de modo a possibilitar a estratificação dos pacientes em diferentes abordagens terapêuticas. *RECK* constitui uma potencial ferramenta prognóstica devido ao fato de ter sido observada uma correlação positiva entre a abundância da expressão de *RECK* em diversos tipos tumorais e um melhor prognóstico para pacientes com tumores gástricos, pulmonares, pancreáticos, renais, e coloretais (Noda M 2007) (Morioka Y 2009).

No presente estudo, observa-se que uma maior expressão de *RECK*, está associada à maior sobrevida global de pacientes com GBM. Além disso, uma maior razão entre a expressão de *RECK* canônico, em relação à expressão de suas variantes

de *splicing*, está associada à uma maior expressão de *RECK* canônico, com maior sobrevida global dos pacientes. Assim, os resultados aqui apresentados sugerem que a expressão relativa das variantes de *RECK*, assim como o balanço dos valores de sua expressão relativa, constituem potenciais ferramentas prognósticas para pacientes com GBM.

5.4.3. Análise funcional das isoformas de RECK em linhagem de Glioblastoma Multiforme humano

Para tentar explicar o envolvimento dos diferentes transcritos de *RECK* no modelo de GBM humano, para os quais identificamos potencial valor prognóstico, foram geradas linhagens derivadas de U87 MG, superexpressando cada uma das isoformas de RECK.

Não foi observada alteração significativa na taxa de proliferação e densidade de saturação das células superexpressando cada uma das isoformas, indicando que as variantes de *RECK* não influenciam esse processo, é importante ressaltar que essa análise foi realizada em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino e que talvez a tendência de menor taxa de crescimento celular em células superexpressando RECK canônico seja evidenciada em condições de privação de soro. Porém, células superexpressando a isoforma canônica de *RECK* apresentam uma tendência a apresentar menor densidade de saturação e maior tempo de dobramento. A influência de RECK canônico no ciclo celular foi abordada na tese da Dra. Sheila Winnischofer, a qual observou que a expressão de RECK induz uma diminuição da taxa de proliferação

em fibroblastos NIH 3T3 de camundongo, acompanhada de menor densidade de saturação, observando-se maior porcentagem de células em GO/G1 mediada por p21 (WInnischofer 2005).

Foi descrito que a superexpressão de *RECK* canônico em células T98G de GBM humano leva à uma diminuição do processo de migração celular através do rearranjo de fibras de actina (Silveira Correa, Massaro et al. 2010). Os resultados de ensaios de invasão por *scratching*, aqui apresentados, confirmam os resultados da literatura, porém os resultados obtidos através de ensaios de migração por Transwell™ não apresentam diferença significativa nesse modelo.

Analisando-se o potencial invasivo apresentado pelas diferentes células nos ensaios de Transwell™ observa-se que células U87 MG superexpressando a isoforma canônica de RECK apresenta um menor potencial invasivo, um resultado que corrobora aqueles da literatura utilizando células T98G superexpressando RECK (Silveira Correa, Massaro et al. 2010). Essa inibição do potencial invasivo não é observada em células superexpressando as demais isoformas alternativas de RECK, indicando que essa função foi perdida pelas isoformas alternativas de RECK. Tendo em vista a importância das MMPs para o potencial invasivo das células, a expressão das *MMPs* classicamente envolvidas com a função de RECK canônico, *MMP-2, -9* e *-14* foram avaliadas nas células superexpressando cada uma das isoformas.

Observa-se que *MMP-9* possui uma tendência de apresentar maior expressão frente à superexpressão das isoformas alternativas de RECK, porém essa diferença não é estatisticamente significativa. Por outro lado, observa-se que a superexpressão de RECK canônico induz uma maior expressão de *MMP-2* e *MMP-14*, o que pode ser parte de um mecanismo de *feedback* frente à inibição dessas proteases por RECK.

Além disso, analisou-se a expressão das TIMPs, que apresentaram correlação positiva de suas expressões com a expressão de *RECK* canônico durante a progressão de astrocitomas. Observa-se que a expressão de *TIMP-2* é induzida pela expressão de RECK canônico, o que é interessante, pois uma maior expressão de *TIMP-2* também está correlacionada com um melhor prognóstico para pacientes com GBM (Oh, Diaz et al. 2006). Além disso, TIMP-2 induz a expressão de *RECK* em modelo vascular (Oh, Seo et al. 2004), sugerindo a existência de um mecanismo indireto de retroalimentação entre estes dois inibidores de MMPs. A expressão de TIMP-3, por sua vez, apresenta uma tendência de aumento de sua expressão frente à superexpressão das isoformas canônica, RECK-B e –D, porém esse aumento não é estatisticamente significativo.

RECK canônico tem sua função classicamente envolvida na inibição da atividade de MMP-2 e -9. Para avaliar se as isoformas geradas por *splicing* alternativo de RECK influenciam a atividade dessas MMPs, ensaios de zimografia foram realizados com o meio condicionado de células superexpressando cada uma das isoformas. Só foi possível detectar a expressão de MMP-2 neste ensaio preliminar, mas os resultados indicam que células superexpressando RECK-B tem a tendência de apresentar maior atividade de MMP-2. Por outro lado, células superexpressando a forma canônica de RECK não apresentam diferença significativa na atividade de MMP-2 quando comparadas ao controle. Os dados obtidos corroboram a hipótese da atuação de RECK-B como um dominante negativo, o qual, ao impedir a inibição de MMP-2 por RECK, resulta em maior atividade da enzima.

Por fim, o potencial tumorigênico das linhagens superexpressando as isoformas de RECK foi avaliado através de ensaios de crescimento em suspensão de agarose. Foi possível observar que células superexpressando a isoforma canônica de RECK

apresentam tendência a originar um número menor de colônias, enquanto RECK-B apresenta um potencial tumorigênico maior, quando comparado ao controle. RECK-D também possui uma tendência a apresentar maior potencial tumorigênico, porém essa tendência não é estatisticamente significativa.

O conjunto dos resultados aqui apresentados leva a propor a seguinte hipótese para atuação das isoformas de RECK: as proteínas geradas pelos transcritos alternativos de *RECK* retém o peptídeo sinal na porção N-terminal do transcrito, o qual sinaliza sua secreção para o meio extracelular. Por não possuírem os sítios SPI que estão presentes na isoforma canônica, sendo relacionados à sua capacidade inibitória de MMP-9, entre outros domínios ainda não funcionalmente caracterizados, as isoformas são incapazes de inibir a atividade de MMPs, e, assim, não atuam inibindo a invasão celular. RECK-B possivelmente está ancorado à membrana, podendo atuar como dominante negativo por formar heterodímeros não funcionais com a proteína canônica, resultando em maior atividade de MMP-2, quando comparada ao controle. Dessa maneira, a maior expressão de *RECK* canônico, e sua maior abundância, em comparação à seus transcritos alternativos, em especial *RECK-B*, está ligada a um melhor prognóstico para pacientes com GBM. Da mesma forma, e células U87 MG superexpressando RECK-B, que apresentam maior abundância de RECK-B em relação à isoforma canônica, apresentam maior potencial tumorigênico (Figura 5.2.3.).

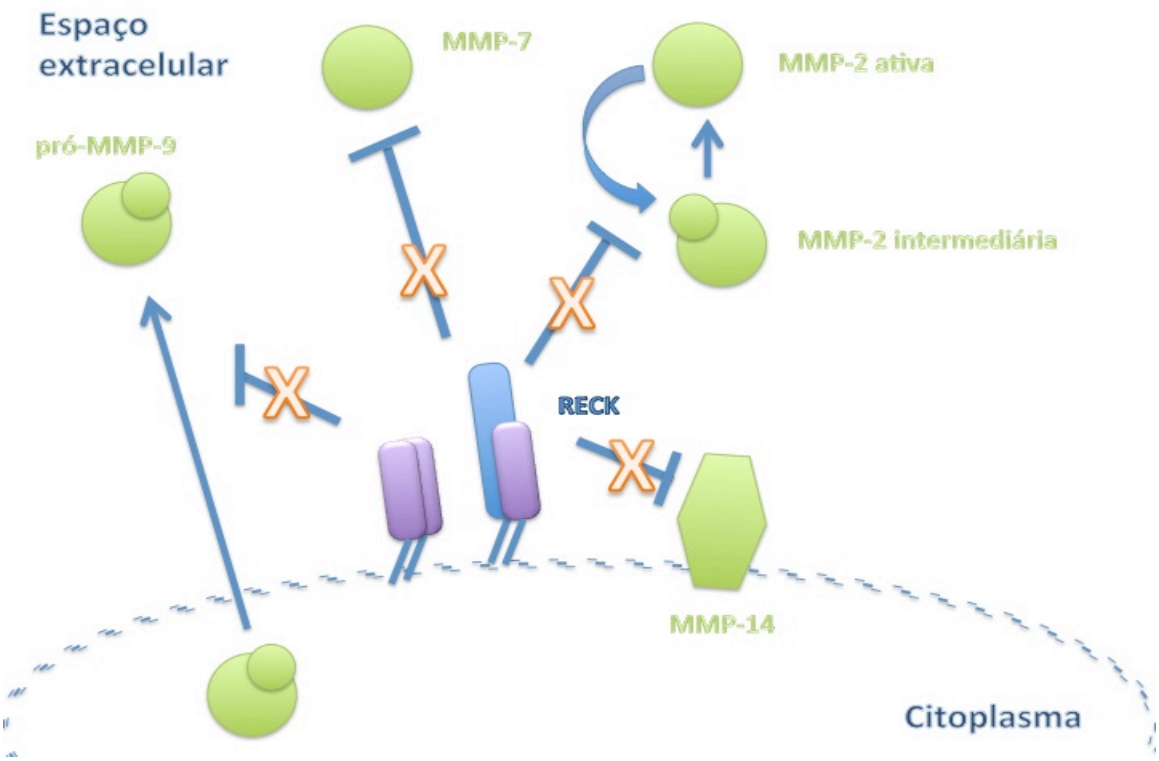


Figura 5.2.3.: Hipótese para o mecanismo de ação de RECK-B. RECK-B atuaria como dominante negativo, formando homodímeros e heterodímeros com RECK canônica não funcionais.

5.5. Envolvimento das variantes de *RECK* durante osprocessos de diferenciação osteogência e adipogênica

A MEC tem papel essencial no nicho de células-tronco, já que pode direta ou indiretamente modular a manutenção, proliferação, autorenovação e diferenciação destas células (Gattazzo, Urciuolo et al. 2014). Durante o desenvolvimento animal, o remodelamento da MEC é constante e a regulação de enzimas remodeladoras da MEC nestes processos é crucial. Foi demonstrado que a incorporação de componentes da

MEC em protocolos de diferenciação de células-tronco aumenta a eficácia do processo (Ma, Tavakoli et al. 2008) (Uemura, Refaat et al. 2010).

A modulação da expressão de RECK foi descrita em diversos modelos. A expressão de RECK canônica é modulada durante a condrogênese, sendo restrita ao centro dos nódulos cartilaginosos, e expresso em fases tardias da diferenciação. Além disso, sua expressão constitutiva *in vitro* inibe a condrogênese a por evitar a agregação inicial de células, o que é necessário para o processo, sendo que sua supressão inibe a concentração de componentes da MEC no centro dos nódulos cartilaginosos (Kondo, Shukunami et al. 2007). Além disso, o promotor de *RECK* está sujeito à regulação por, pelo menos, dois fatores de transcrição: MyoD e MRF4, sendo sua expressão ativada por MRF4 e silenciada por MyoD. Acredita-se que a supressão de *RECK* seja necessária em estágios tardios para a formação de miotubulos (Echizenya, Kondo et al. 2005). Foi demonstrado também que GDE2 (*Glicerophosphodiesterphosphodiesterase 2*) induz a diferenciação de neurônios motores por inibir a via de Notch mediada por RECK, através da metabolização da âncora GPI de RECK e sua liberação da membrana (Park, Lee et al. 2013).

Para investigar o papel das variantes de *RECK* descritas neste trabalho em modelos não tumorais, abrindo novas perspectivas para seu estudo, o perfil de expressão destes transcritos foi determinado em dois modelos de diferenciação: osteogênica e adipogênica.

A expressão de *RECK* foi descrita como sendo modulada durante os processos de osteogênese e remodelação óssea. Ao contrário do senso comum, os ossos são órgãos relativamente dinâmicos que sofrem mudanças significativas ao longo de sua vida, sendo afetados por condições patológicas e fisiológicas distintas, como, por

exemplo, injúrias e envelhecimento. Dentre as células do tecido ósseo, os osteoblastos possuem atuação chave na formação óssea, secretando e agregando os componentes da matriz extracelular óssea (Zambuzzi, Yano et al. 2009). Os osteoblastos são células de origem mesenquimal que produzem a maioria das proteínas presentes na matriz extracelular óssea e, além disso, também controlam sua mineralização (Carreira, Lojudice et al. 2014) (Zambuzzi, Yano et al. 2009). As MMP-2 e -9 estão envolvidas na osteogênese, e as modificações em seus perfis de expressão podem ser atribuídas à maturação do colágeno da MEC induzida por ascorbato (Mizutani, Sugiyama et al. 2001) (Zambuzzi, Yano et al. 2009). Foi descrito que a expressão de RECK canônico diminui em estágios tardios do processo de osteogênese *in vitro*, apresentando perfil inverso ao de TIMP-2 (Zambuzzi, Yano et al. 2009).

O perfil de expressão de mRNA das *MMPs* alvos da inibição de RECK canônico, *MMP-2,-9* e *-14*, foi determinado durante a progressão do protocolo de osteogênese. Observa-se que todas as MMPs analisadas apresentam uma tendência a apresentar um perfil de diminuição da expressão conforme a progressão do protocolo, porém essa modulação só é expressiva em relação à *MMP-9*. Os resultados aqui apresentados corroboram dados da literatura que descrevem a maior expressão de *MMP-14* em estágios iniciais de diferenciação, porém, encontram-se discrepâncias quanto à expressão de *MMP-2* e *-9 (Mizutani, Sugiyama et al. 2001)* (Panagakos and Kumar 1995).

O perfil de expressão dos inibidores endógenos de MMPs e TIMPs, também foi determinado. Os resultados apresentados indicam que não há modulação siginificativa da expressão destes genes durante a osteogênese, porém *TIMP-1* e *-3* apresentam uma tendência a apresentar expressão diminuída no dia 14 do protocolo.

Quanto ao perfil de expressão das variantes de *RECK* durante o processo de diferenciação osteogênica, os resultados indicam que RECK canônico tem uma tendência à expressão diminuída em estágios mais tardios do protocolo, apesar de não apresentar significância estatística, corroborando os resultados da literatura. Porém, os transcritos alternativos de *RECK* aparentemente não são modulados.

A análise do balanço da expressão de mRNA dos transcritos de *RECK* revela que a razão de expressão de *RECK-B* por *RECK* aumenta durante a osteogênese, enquanto que as razões entre *RECK-D/RECK e* entre *RECK-I/RECK* apresentam um pico no dia 14 do protocolo, porém essa tendência não é estatisticamente significativa.

Adipócitos são originados a partir de células-tronco mesequimais multipotentes, podendo ser encontradas em depósitos ao longo do corpo e em meio a outros tipos celulares, em diferentes localizações, especialmente em pontos de tecido conjuntivo frouxo (Rosen and MacDougald 2006). Entre os componentes secretados pelos adipócitos está o VEGF, diretamente ligado à angiogênese, que se faz necessária para o crescimento da massa de gordura no corpo. A secreção desses fatores aumenta durante a diferenciação adipogênica, o que sustenta a hipótese de uma conexão hormonal entre a diferenciação adipogênica e a estimulação do processo angiogênico. Foi descrito que o primeiro passo da angiogênese envolve a degradação da MEC, com as MMP-2 e MMP-9 mostrando-se especialmente necessárias neste processo. O tecido adiposo secreta MMP-2 e MMP-9 e a atividade das MMPs está diretamente relacionada à regulação da diferenciação adipogênica, aumentando conforme o andamento do protocolo de diferenciação, sendo que o bloqueio dessas gelatinases resulta no bloqueio da diferenciação adipogênica (Bouloumie, Sengenes et al. 2001).

Os resultados aqui apresentados mostram que o perfil de expressão de *MMP-2* e

-14 apresenta uma tendência de aumento conforme a progressão do protocolo de diferenciação adipogênica, corroborando os dados encontrados na literatura. Por outro lado, a expressão de MMP-9 apresenta uma tendência de diminuição durante esse processo, apesar de também não apresentar significância estatística, perfil contrário aquele observado anteriormente na literatura.

O perfil de expressão dos inibidores endógenos de MMPs, TIMPs, durante o protocolo de indução de adipogênese indica que *TIMP-2* e *-4*, apresentam perfil de aumento da expressão conforme a progressão desta diferenciação, apesar de *TIMP-2* não apresentar significância estatística. *TIMP-1* apresenta um vale de expressão no dia 14 do protocolo e *TIMP-3* aparentemente não é modulado neste modelo.

Nossos resultados indicam que *RECK* canônico tem sua expressão de mRNA aumentada em estágios mais tardios da osteogênese. *RECK- B* e *–D*, apresentam uma tendência a ter um pico de expressão no dia 14 do protocolo, apesar de não apresentarem significância estatística, e RECK-I aparentemente não é modulado neste modelo. A razão entre a expressão do mRNA do transcrito canônico em relação aos seus transcritos alternativos aumentam conforme a progressão do protocolo, padrão inverso àquele observado durante a osteogênese.

Em conjunto, os resultados mostram que o balanço da expressão relativa das variantes de *RECK* apresenta perfil diferencial durante os processos de diferenciação osteogênica e adipogênica, sendo que estes perfis são inversos nos dois processos, sugerindo que o balanço entre a expressão das isoformas pode ser um indicativo do comprometimento celular com a diferenciação, possivelmente apresentando um papel nestes processos, o que merece ser explorado.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

a. O gene supressor de tumor *RECK* possui ao menos três variantes geradas por *splicing* alternativo, resultantes da seleção de sítios de *splicing* 3' alternativos no reconhecimento da fronteira intron 8/ exon9.
b. As três variantes descritas, *RECK-B, -D*, e *–I* codificam proteínas que são menores que a proteína canônica, e que, segundo suas sequências preditas, compartilham seus 213 amino ácidos iniciais com a forma canônica e entre as isoformas. As três isoformas não possuem domínios SPI envolvidos na inibição da atividade de MMP-9 por RECK canônico.
c. RECK-B possivelmente é ancorado à membrana plasmática, da mesma forma que o RECK canônico.
d. Os três transcritos alternativos de *RECK* são expressos em tecidos humanos normais e possuem balanços de expressão específicos para cada variante, em relação ao transcrito canônico.
e. *RECK* canônico e seus transcritos alternativos *RECK-B* e *–D* apresentam o mesmo perfil diferencial durante a progressão de astrocitomas, apresentando menor expressão em amostras de GBM, quando comparadas a amostras de astrocitomas grau II.
f. A expressão de *TIMP-3* correlaciona com a expressão dos transcritos canônico, *RECK-B* e *RECK-I* durante a progressão de astrocitomas. A expressão de *TIMP-*

2 correlaciona com a expressão do transcrito canônico de *RECK* e a expressão de *RECK-I* também correlaciona com a expressão de *MMP-2, -14* e *TIMP-1*.

g. A expressão de *RECK* canônico, juntamente com uma maior abundância da expressão deste transcrito em relação às suas variantes de *splicing* alternativo, está relacionada a um melhor prognóstico para pacientes com GBM.

h. Células U87 MG superexpressando as isoformas alternativas de *RECK* não apresentam inibição de seu potencial invasivo, o que é observado quando da superexpressão da proteína canônica de RECK.

i. A superexpressão de RECK canônico em células U87 MG induz a expressão de mRNA de *MMP-2, -14* e *TIMP-2*, enquanto que a superexpressão das isoformas alternativas de RECK apresenta, como tendência, uma maior expressão de MMP-9 e TIMP-3.

j. Células U87 MG superexpressando RECK-B apresentam maior potencial de crescimento em suspensão, dado que é relacionada ao potencial tumorigênico das células, quando comparadas ao controle.

k. Os balanços entre a expressão do transcrito canônico de *RECK* e seus transcritos alternativos apresentam perfil diferencial e inversos durante as diferenciações oesteogênica e adipogênica, mostrando que as variantes de RECK potencialmente possuem também um papel em modelos não-tumorigênicos.

7. Perspectivas

As perspectivas que se abrem a partir dos resultados obtidos são:

a. Finalização dos ensaios de RACE para confirmação das sequências integradas dos transcritos *RECK-B* e *–I* para submissão ao GenBank.
b. Purificação, por HPLC, das isoformas proteicas de RECK fusionadas à uma cauda de histidina em seu C-terminal e determinação de suas sequências.
c. Produção de anticorpos para a detecção dos níveis de expressão das proteínas endógenas de RECK-B, -D e –I.
d. Análise da localização subcelular de RECK-B através de extratos proteicos específicos de diferentes compartimentos celulares e expressão da proteína RECK-B fusionada em sua porção N-terminal a EGFP.
e. Finalização dos ensaios de zimografia frente à superexpressão de cada uma das isoformas de *RECK.*
f. Ensaios de tumorigenicidade *in vivo* com células superexpressando RECK canônico e RECK-B, avaliando parâmetros histopatológicos nos tumores gerados, assim como a vascularização tumoral.
g. Estudo funcional de linhagens apresentando a supressão da expressão das isoformas de *RECK* por shRNA.

h. Avaliação funcional das variantes de RECK em modelo de células mesenquimais humanas, através da superexpressão das isoformas em células mesenquimais humanas e posterior avaliação de seu potencial de autorenovação e eficiência dos processos de diferenciação osteogênica e adipogênica.

8. Referências Bibliográficas

AABERG-JESSEN, C. *et al.* Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *J Neurooncol* [S.I.], v. 95, n. 1, p. 117-28, Oct 2009.

AHMADLOO, N. *et al.* Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* [S.I.], v. 25, n. 1, p. 21-30, Mar 2013.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* [S.I.], v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990.

AMOUR, A. *et al.* The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS letters* [S.I.], v. 473, n. 3, p. 275-9, May 19 2000.

ANCZUKOW, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nature structural & molecular biology* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 220-8, Feb 2012.

ANTON, K. *et al.* Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives. *Hematology/oncology clinics of North America* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 825-53, Aug 2012.

ASHER, R.; BIGNAMI, A. Hyaluronate binding and CD44 expression in human glioblastoma cells and astrocytes. *Experimental cell research* [S.I.], v. 203, n. 1, p. 80- 90, Nov 1992.

BAKER, A. H. *et al.* Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science* [S.I.], v. 115, n. Pt 19, p. 3719-27, Oct 1 2002.

BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et biophysica acta* [S.I.], v. 1825, n. 1, p. 29-36, Jan 2012.

BELLAIL, A. C. *et al.* Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology* [S.I.], v. 36, n. 6, p. 1046-69, Jun 2004.

BERGET, S. M.; SHARP, P. A. A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA. *Brookhaven symposia in biology* [S.I.], n. 29, p. 332-44,

May 12-20 1977.

BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 320-9, Mar 2011.

BLAUSTEIN, M. *et al.* Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nature structural & molecular biology* [S.I.], v. 12, n. 12, p. 1037-44, Dec 2005.

BOISE, L. H. *et al.* bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* [S.I.], v. 74, n. 4, p. 597-608, Aug 27 1993.

BONNAL, S. *et al.* The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nature reviews. Drug discovery* [S.I.], v. 11, n. 11, p. 847-59, Nov 2012.

BOULOUMIE, A. *et al.* Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* [S.I.], v. 50, n. 9, p. 2080-6, Sep 2001.

BRELL, M. *et al.* Quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 mRNA expression in central and peripheral regions of gliomas. *Brain Tumor Pathol* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 137-44, Apr 2011.

BRINKMAN BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* [S.I.], v. 37, n. 7, p. 584-94, 2004.

BROWN-BRYAN, T. A. *et al.* Alternative splicing and caspase-mediated cleavage generate antagonistic variants of the stress oncoprotein LEDGF/p75. *Molecular cancer research : MCR* [S.I.], v. 6, n. 8, p. 1293-307, Aug 2008.

BUNATOVA, K. *et al.* Plasma TIMP1 level is a prognostic factor in patients with liver metastases. *Anticancer research* [S.I.], v. 32, n. 10, p. 4601-6, Oct 2012.

CARREIRA, A. C. *et al.* Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives. *J Dent Res* [S.I.], Jan 3 2014.

CHAKRABORTI, S. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* [S.I.], v. 253, n. 1-2, p. 269-85, Nov 2003.

CHANG, C. K. *et al.* The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo. *J Cell*

Mol Med [S.I.], v. 12, n. 6B, p. 2781-9, Dec 2008.

CORREA, T. C. *et al.* Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. *Journal of cellular biochemistry* [S.I.], v. 99, n. 1, p. 156-67, Sep 1 2006.

CROCKER, M. *et al.* Serum angiogenic profile of patients with glioblastoma identifies distinct tumor subtypes and shows that TIMP-1 is a prognostic factor. *Neuro-oncology* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 99-108, Jan 2011.

CUNLIFFE, C. H. *et al.* State-of-the-art pathology: new WHO classification, implications, and new developments. *Neuroimaging clinics of North America* [S.I.], v. 20, n. 3, p. 259- 71, Aug 2010.

DANG, L. *et al.* IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends in molecular medicine* [S.I.], v. 16, n. 9, p. 387-97, Sep 2010.

DAS, S. *et al.* Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell reports* [S.I.], v. 1, n. 2, p. 110-7, Feb 23 2012.

DE CONTI, L. *et al.* Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 49-60, Jan-Feb 2013.

DESMET, F. O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 37, n. 9, p. e67, May 2009.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DU, R. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro-oncology* [S.I.], v. 10, n. 3, p. 254-64, Jun 2008.

DUBRIDGE, R. B.; CALOS, M. P. Molecular Approaches to the Study of Gene Mutation in Human-Cells. *Trends in Genetics* [S.I.], v. 3, n. 10, p. 293-297, Oct 1987.

ECHIZENYA, M. *et al.* The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. *Oncogene* [S.I.], v. 24, n. 38, p. 5850-7, Sep 1 2005.

EISENBERG, I. *et al.* Establishment of the genomic structure and identification of

thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. *Cytogenetic and genome research* [S.I.], v. 97, n. 1-2, p. 58-61, 2002.

FAIRBROTHER, W. G. *et al.* Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* [S.I.], v. 297, n. 5583, p. 1007-13, Aug 9 2002.

FAUSTINO NA, C. T. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 419-37, 2003.

FIGUEIRA, R. C. *et al.* Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. *BMC cancer* [S.I.], v. 9, p. 20, 2009.

FORNI, M. F. *Bases Moleculares da Depleção de Glutationa sobre a Potencialidade, Diferenciação e Envelhecimento de Células-tronco de Pele*. (2013). Doutorado - Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

FORSYTH, P. A. *et al.* Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* [S.I.], v. 79, n. 11-12, p. 1828-35, Apr 1999.

FURUMOTO, K. *et al.* RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse- inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. *Hepatology* [S.I.], v. 33, n. 1, p. 189-95, Jan 2001.

GABELLONI, P. *et al.* Inhibition of metalloproteinases derived from tumours: new insights in the treatment of human glioblastoma. *Neuroscience* [S.I.], v. 168, n. 2, p. 514- 22, Jun 30 2010.

GABRIELY, G. *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* [S.I.], v. 28, n. 17, p. 5369-80, Sep 2008.

GATTAZZO, F. *et al.* Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], Jan 10 2014.

GERMANN, S. *et al.* Splicing programs and cancer. *Journal of nucleic acids* [S.I.], v. 2012, p. 269570, 2012.

GOMES, L. R. *et al.* TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC cancer* [S.I.], v. 12, p. 26, 2012.

GORBUNOVA, V. *et al.* Genome-wide demethylation destabilizes CTG.CAG trinucleotide repeats in mammalian cells. *Hum Mol Genet* [S.I.], v. 13, n. 23, p. 2979-89, Dec 1 2004.

GROFT, L. L. *et al.* Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *British journal of cancer* [S.I.], v. 85, n. 1, p. 55-63, Jul 6 2001a.

HAGEMANN, C. *et al.* A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J Clin Oncol* [S.I.], v. 3, n. 5, p. 67-79, May 10 2012a.

HAN, L. *et al.* MicroRNA-21 expression is regulated by beta-catenin/STAT3 pathway and promotes glioma cell invasion by direct targeting RECK. *CNS neuroscience & therapeutics* [S.I.], v. 18, n. 7, p. 573-83, Jul 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [S.I.], v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARASAWA, R. *et al.* Nucleotide sequence of the arginine deiminase gene of Mycoplasma hominis. *Microbiology and immunology* [S.I.], v. 36, n. 6, p. 661-5, 1992.

HOSHI, M. *et al.* Antitumoral effects of defective herpes simplex virus-mediated transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene in malignant glioma U87 in vitro: consequences for anti-cancer gene therapy. *Cancer gene therapy* [S.I.], v. 7, n. 5, p. 799-805, May 2000.

http://www.WHO.INT/EN/. January 2014.

ISAKA, K. *et al.* Matrix metalloproteinase-26 is expressed in human endometrium but not in endometrial carcinoma. *Cancer* [S.I.], v. 97, n. 1, p. 79-89, Jan 1 2003.

ISHII, N. *et al.* Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 469-79, Jul 1999a.

ITOH, T. *et al.* The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* [S.I.], v. 169, n. 5, p.

2643-7, Sep 1 2002.

ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem* [S.I.], v. 38, p. 21-36, 2002a.

JIN, M. *et al.* Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 28-33, 2001.

KENT, W. J. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* [S.I.], v. 12, n. 4, p. 656-64, Apr 2002.

KITANGE, G. J. *et al.* Inhibition of histone deacetylation potentiates the evolution of acquired temozolomide resistance linked to MGMT upregulation in glioblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* [S.I.], v. 18, n. 15, p. 4070-9, Aug 1.

KLEIHUES, P. *et al.* The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology* [S.I.], v. 3, n. 3, p. 255-68, Jul 1993.

KONDO, S. *et al.* Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Cell Sci* [S.I.], v. 120, n. Pt 5, p. 849-57, Mar 1 2007.

KORNBLIHTT, A. R. Promoter usage and alternative splicing. *Current opinion in cell biology* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 262-8, Jun 2005.

KORPOS, E. *et al.* Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Current pharmaceutical design* [S.I.], v. 15, n. 12, p. 1349-57, 2009.

KREISL, T. N. *et al.* Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [S.I.], v. 27, n. 5, p. 740-5, Feb 10 2009.

LALEZARI, S. *et al.* Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol* [S.I.], v. 15, n. 3, p. 370-81, Mar.

LAMBERT, E. *et al.* TIMPs as multifacial proteins. *Critical reviews in oncology/hematology* [S.I.], v. 49, n. 3, p. 187-98, Mar 2004.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical biochemistry* [S.I.],

v. 249, n. 1, p. 24-8, Jun 15 1997.

LEVICAR, N. *et al.* Proteases in brain tumour progression. *Acta neurochirurgica* [S.I.], v. 145, n. 9, p. 825-38, Sep 2003.

LEWIN, B. Genes IX. 2010.

LIANG, C. C. *et al.* In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.

LIN, Y. *et al.* Plasma levels of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 correlate with diagnosis and prognosis of glioma patients. *Chinese medical journal* [S.I.], v. 126, n. 22, p. 4295-300, Nov 2013.

LINDER, S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in cell biology* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 107-17, Mar 2007.

LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Activation of ADAM 12 protease by copper. *FEBS letters* [S.I.], v. 506, n. 1, p. 65-8, Sep 28 2001.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* [S.I.], v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007.

MA, W. *et al.* Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol* [S.I.], v. 8, p. 90, 2008.

MASUI, T. *et al.* RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [S.I.], v. 9, n. 5, p. 1779-84, May 2003.

MIKI T, T. Y., OKAWA K, MURAGUCHI T, NODA M, TAKAHASHI C. The reversion- inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem* [S.I.], v. 282, n. 16, p. 12341-52, 2007.

MIZUTANI, A. *et al.* Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* [S.I.], v. 16, n. 11, p. 2043-9, Nov 2001.

MORIOKA Y, M. J., MATSUZAKI T, SHI S, ALEXANDER DB, KITAYAMA H,

NODA M. The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions

and anterior-posterior polarity in fibroblasts. *Oncogene* [S.I.], v. 28, n. 11, p. 1454-64, 2009.

MOUNT, S. M. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 459-72, Jan 22 1982.

MRUGALA, M. M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discovery medicine* [S.I.], v. 15, n. 83, p. 221-30, Apr 2013.

MURAGUCHI T, T. Y., OHTSUKA T, KITAJIMA S, CHANDANA EP, OMURA A, MIKI T, TAKAHASHI R, MATSUMOTO N, LUDWIG A, NODA M, TAKAHASHI C. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci* [S.I.], v. 10, n. 7, p. 838-45, 2007.

NAGASHIMA, G. *et al.* Immunohistochemical analysis of reactive astrocytes around glioblastoma: an immunohistochemical study of postmortem glioblastoma cases. *Clinical neurology and neurosurgery* [S.I.], v. 104, n. 2, p. 125-31, May 2002.

NAKADA, M. *et al.* Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *Journal of neurosurgery* [S.I.], v. 94, n. 3, p. 464-73, Mar 2001.

NAKAMURA, M. *et al.* Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* [S.I.], v. 85, n. 2, p. 165-75, Feb 2005.

NAOR D, N. S., GOLAN I, MELNIK L, FAITELSON Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* [S.I.], v. 39, n. 6, p. 527-79, 2002.

NERI, A. *et al.* Is tissue inhibitor of metalloproteinase-1 a new prognosticator for breast cancer? An analysis of 266 cases. *Human pathology* [S.I.], v. 43, n. 8, p. 1184-91, Aug 2012.

NODA, M.; TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. *Cancer science* [S.I.], v. 98, n. 11, p. 1659-65, Nov 2007.

OBA-SHINJO, S. M. *et al.* Identification of novel differentially expressed genes in human astrocytomas by cDNA representational difference analysis. *Brain*

research. Molecular brain research [S.I.], v. 140, n. 1-2, p. 25-33, Oct 31 2005.

OH, J. *et al.* TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. *Oncogene* [S.I.], v. 25, n. 30, p. 4230-4, Jul 13 2006.

OH, J. *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res* [S.I.], v. 64, n. 24, p. 9062-9, Dec 15 2004.

OH, J. *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* [S.I.], v. 107, n. 6, p. 789-800, Dec 14 2001.

OH J, T. R., KONDO S, MIZOGUCHI A, ADACHI E, SASAHARA RM, NISHIMURA S, IMAMURA Y, KITAYAMA H, ALEXANDER DB, IDE C, HORAN TP, ARAKAWA T, YOSHIDA H, NISHIKAWA S, ITOH Y, SEIKI M, ITOHARA S, TAKAHASHI C, NODA M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* [S.I.], v. 107, n. 6, p. 789-800, 2001.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology* [S.I.], v. 170, n. 5, p. 1445-53, May 2007.

OMURA, A. *et al.* RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem* [S.I.], v. 284, n. 6, p. 3461-9, Feb 6 2009.

ORBAN TI, O. E. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol Pathol* [S.I.], v. 56, n. 4, p. 191-7, 2003.

PAJARES, M. J. *et al.* Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *The lancet oncology* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 349-57, Apr 2007.

PAN, Q. *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics* [S.I.], v. 40, n. 12, p. 1413-5, Dec 2008.

PANAGAKOS, F. S.; KUMAR, S. Differentiation of human osteoblastic cells in culture: modulation of proteases by extracellular matrix and tumor necrosis factor-alpha. *Inflammation* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 423-43, Aug 1995.

PAPP LV, W. J., KENNEDY D, BOUCHER D, ZHANG Y, GLADYSHEV VN, SINGH RN, KHANNA KK. Functional characterization of alternatively spliced human SECISBP2 transcript variants. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 36, n. 22, p. 7192-206, 2008.

PARK, S. *et al.* GDE2 promotes neurogenesis by glycosylphosphatidylinositol-anchor cleavage of RECK. *Science* [S.I.], v. 339, n. 6117, p. 324-8, Jan 18 2013.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT- PCR. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.

POLISETTY, R. V. *et al.* Glioblastoma cell secretome: analysis of three glioblastoma cell lines reveal 148 non-redundant proteins. *Journal of proteomics* [S.I.], v. 74, n. 10, p. 1918-25, Sep 6 2011a.

PONTEN, J.; MACINTYRE, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* [S.I.], v. 74, n. 4, p. 465-86, 1968.

RABIEN, A. *et al.* Renal cell neoplasias: reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs discriminates tumor subtypes, while extracellular matrix metalloproteinase inducer indicates prognosis. *Journal of translational medicine* [S.I.], v. 11, p. 258, 2013.

RAHMAH, N. N. *et al.* Expression of RECK in endothelial cells of glioma: comparison with CD34 and VEGF expressions. *Journal of neuro-oncology* [S.I.], v. 107, n. 3, p. 559- 64, May 2012.

RAO, J. S. *et al.* Expression and localization of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase B (MMP-9) in human gliomas. *Clinical & experimental metastasis* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 12-8, Jan 1996.

RAO, V. H. *et al.* Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV collagenases/gelatinases), and MT1-MMP in canine X-linked Alport syndrome (XLAS). *Kidney international* [S.I.], v. 63, n. 5, p. 1736-48, May 2003.

RODRIGUEZ, F. J. *et al.* E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochimica et biophysica acta* [S.I.], v. 1826, n. 1, p. 23-31, Aug 2012.

RORIVE, S. *et al.* TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [S.I.], v. 23, n. 10, p. 1418-28, Oct 2010.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 7, n. 12, p. 885-96, Dec 2006.

ROY M, X. Q., LEE C. Evidence that public database records for many cancer-associated genes reflect a splice form found in tumors and lack normal splice forms. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 33, n. 16, p. 5026-33, 2005.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental biology* [S.I.], v. 341, n. 1, p. 126-40, May 1 2010.

RUOSLAHTI, E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* [S.I.], v. 6, n. 5, p. 489-92, Jul 1996.

SANGER, F. *et al.* Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 70, n. 4, p. 1209-13, Apr 1973.

SASAHARA RM, B. S., TAKAHASHI C, OH J, MARIA-ENGLER SS, GRANJEIRO JM, NODA M, SOGAYAR MC. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer Detect Prev* [S.I.], v. 26, n. 6, p. 435-43, 2002.

SCHOLZOVA, E. *et al.* RNA regulation and cancer development. *Cancer letters* [S.I.], v. 246, n. 1-2, p. 12-23, Feb 8 2007.

SCHOLZOVÁ E, M. R., SEVCÍK J, KLEIBL Z. RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett.* [S.I.], v. 246, n. 1-2, p. 12-23, 2007.

SCHWARTZBAUM, J. A. *et al.* Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice. Neurology* [S.I.], v. 2, n. 9, p. 494-503; quiz 1 p following 516, Sep 2006.

SHUMAN MOSS, L. A. *et al.* Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *The American journal of pathology* [S.I.], v. 181, n. 6, p. 1895-9, Dec 2012.

SHUMAN, S. Site-specific DNA cleavage by vaccinia virus DNA topoisomerase I. Role of nucleotide sequence and DNA secondary structure. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 266, n. 3, p. 1796-803, Jan 25 1991.

_____. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using

vaccinia DNA topoisomerase. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 269, n. 51, p. 32678-84, Dec 23 1994.

SILLAT, T. *et al.* Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation. *J Cell Mol Med* [S.I.], v. 16, n. 7, p. 1485-95, Jul 2012.

SILVEIRA CORREA, T. C. *et al.* RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. *J Cell Biochem* [S.I.], v. 110, n. 1, p. 52-61, May 2010a.

_____. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. *Journal of cellular biochemistry* [S.I.], v. 110, n. 1, p. 52-61, May 2010b.

SINGH, D. P. *et al.* Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 267, n. 1, p. 373-81, Jan 7 2000a.

SKOTHEIM, R. I.; NEES, M. Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *The international journal of biochemistry & cell biology* [S.I.], v. 39, n. 7-8, p. 1432-49, 2007.

SPAN PN, S. C., MANDERS P, BEEX LV, LEPPERT D, LINDBERG RL. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. *Cancer* [S.I.], v. 97, n. 11, p. 2710-5, 2003.

SPIEGEL, B. M. *et al.* Clinical impact of adjuvant chemotherapy in glioblastoma multiforme : a meta-analysis. *CNS drugs* [S.I.], v. 21, n. 9, p. 775-87, 2007.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* [S.I.], v. 17, p. 463-516, 2001.

STETLER-STEVENSON, W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* [S.I.], v. 1, n. 27, p. re6, 2008a.

_____. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer metastasis reviews* [S.I.], v. 27, n. 1, p. 57-66, Mar 2008b.

STRAUSBERG, R. L. *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full- length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.],

v. 99, n. 26, p. 16899-903, Dec 24 2002.

STUPP, R. *et al.* Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Current neurology and neuroscience reports* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 198-206, May 2005.

TAKAHASHI, C. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 95, n. 22, p. 13221-6, Oct 27 1998a.

TAKAHASHI C, S. Z., HORAN TP, KITAYAMA H, MAKI M, HITOMI K, KITAURA Y, TAKAI S, SASAHARA RM, HORIMOTO A, IKAWA Y, RATZKIN BJ, ARAKAWA T, NODA M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 95, n. 22, p. 13221-6, 1998.

TAKENAKA, K. *et al.* Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *European journal of cancer* [S.I.], v. 40, n. 10, p. 1617-23, Jul 2004.

TAKENAKA, K. *et al.* Prognostic significance of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs expression in resected pathologic stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer. *Annals of surgical oncology* [S.I.], v. 12, n. 10, p. 817-24, Oct 2005.

TALLANT, C. *et al.* Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et biophysica acta* [S.I.], v. 1803, n. 1, p. 20-8, Jan 2010.

TANAKA, S. *et al.* Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? *Nature reviews. Clinical oncology* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 14-26, Jan 2013.

TANAKA, S. *et al.* Presentation, management, and outcome of newly diagnosed glioblastoma in elderly patients. *Journal of neurosurgery* [S.I.], v. 118, n. 4, p. 786-98, Apr 2013.

TATAR, Z. *et al.* Temozolomide and unusual indications: review of literature. *Cancer treatment reviews* [S.I.], v. 39, n. 2, p. 125-35, Apr 2013.

TAYLOR, T. E. *et al.* Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Current cancer drug targets* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 197-209, Mar 2012.

THON, N. *et al.* Personalized treatment strategies in glioblastoma: promoter methylation status. *OncoTargets and therapy* [S.I.], v. 6, p. 1363-1372, 2013.

TILGNER, H. *et al.* Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature structural & molecular biology* [S.I.], v. 16, n. 9, p. 996-1001, Sep 2009.

TISCORNIA, G. *et al.* Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs. *Nature protocols* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 234-40, 2006a.

_____. Production and purification of lentiviral vectors. *Nature protocols* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 241-5, 2006b.

TOOLE, J. M. *et al.* Selective endothelin-1 receptor type A inhibition in subjects undergoing cardiac surgery with preexisting left ventricular dysfunction: Influence on early postoperative hemodynamics. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* [S.I.], v. 139, n. 3, p. 646-54, Mar 2010.

TROEBERG, L.; NAGASE, H. Measurement of matrix metalloproteinase activities in the medium of cultured synoviocytes using zymography. *Methods in molecular biology* [S.I.], v. 225, p. 77-87, 2003.

TROMBETTA-LIMA, M. *et al.* Divergent roles for Tumor Suppressor Genes in Cancer. In: GUNDUZ, M.; GUNDUZ, E. (Ed.). *Tumor Suppressor Genes: Functions, Regulation and Health Effects*. Ankara: Nova Publishers, 2013.

UEMURA, M. *et al.* Matrigel supports survival and neuronal differentiation of grafted embryonic stem cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res* [S.I.], v. 88, n. 3, p. 542-51, Feb 15 2010.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* [S.I.], v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* [S.I.], v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2 2003.

VOET, J. G.; VOET, D. Biochemistry 4th Edition. 2010.

WANG, Y.; JIANG, T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer letters* [S.I.], v. 331, n. 2, p. 139-46, May 1 2013.

WANG, Z. *et al.* Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* [S.I.], v. 119, n. 6, p. 831-45, Dec 17 2004.

WATSON *et al. Biologia Molecular do Gene*. ArtMed, 2006.

WEG-REMERS, S. *et al.* Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP- kinase pathway. *The EMBO journal* [S.I.], v. 20, n. 15, p. 4194-203, Aug 1 2001.

WINNISCHOFER, S. M. B. *Caracterização do Envolvimento do gene RECK na proliferação celular e progressão tumoral: inversa correlação com a expressão do oncogene C-myc*. (2005). - Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, 2005.

YEO, D. S. *et al.* Expanded utility of the native chemical ligation reaction. *Chemistry* [S.I.], v. 10, n. 19, p. 4664-72, Oct 4 2004.

YEO, G.; BURGE, C. B. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* [S.I.], v. 11, n. 2-3, p. 377-94, 2004.

ZAMBUZZI, W. F. *et al.* Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Mol Cell Biochem* [S.I.], v. 322, n. 1-2, p. 143-50, Feb 2009.

ZAMECNIK, J. The extracellular space and matrix of gliomas. *Acta neuropathologica* [S.I.], v. 110, n. 5, p. 435-42, Nov 2005.

ZHANG, H. *et al.* Neurocan-GFP fusion protein: a new approach to detect hyaluronan on tissue sections and living cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* [S.I.], v. 52, n. 7, p. 915-22, Jul 2004.

ZOU M, G. Y., REN H, ZHANG F, CHEN F. Characterization of alternative splicing products of bZIP transcription factors OsABI5. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 360, n. 2, p. 307-313, 2007.

SÚMULA CURRICULAR

Marina Trombetta Lima

1. Formação

Formação Acadêmica

2008 Doutorado em Bioquímica
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, Brasil

2004-2007 Graduação em Bacharelado em Ciências Moleculares
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

2003-2008 Graduação em Bacharelado em Química
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Formação complementar

2011 Estágio de Doutorado Sanduíche
National Cancer Institute, National Institutes of Health
MD, Maryland, EUA

2009 Curso pré- doutorado Molecular Biology of the Cell.
(Carga horária: 160h).
Institut Pasteur.

2003-2007 Iniciação Científica
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, Brasil

2. Atuação professional

2008-Atual Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento Funcional: Doutorado Direto, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Orientador (a): Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Projeto: ANÁLISE DO PAPEL DO GENE SUPRESSOR DE TUMOR RECK NA REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E CARACTERIZAÇÃO DE SUA ISOFORMA ALTERNATIVA,
Instituição: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, Brasil

2011-2012 Vínculo: Bolsista CAPES - FULBRIGHT, Enquadramento Funcional: Doutorado Sanduíche, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Orientador (a): Prof. Dr. William Stetler-Stevenson
Projeto: Análise funcional de três isoformas de splicing alternativo do gene supressor de tumor *RECK*
Instituição: National Cancer Institute, National Institutes of Health MD, Maryland, EUA

2004-2007 Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva
Orientador (a): Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Instituição: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, Brasil

3. Produção bibliográfica

Downregulation of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in malignant melanoma: inverse correlation with membrane-type 1-matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase 2.

Thiago Jacomasso, **Marina Trombetta-Lima**, Mari C Sogayar, Sheila M B Winnischofer. Melanoma research 02/2014; 24(1):32-39. · **2.06 Impact Factor**

Expression of tissue factor signaling pathway elements correlates with the production of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in human astrocytoma patients.

Tatiana C Carneiro-Lobo, **Marina T Lima**, Andréa Mariano-Oliveira, Angélica Dutra-Oliveira, Sueli M Oba-Shinjo, Suely K N Marie, Mari C Sogayar, Robson Q Monteiro Oncology Reports 11/2013; · **2.30 Impact Factor**

(Capitulo de livro) Divergent Roles for Tumor Suppressor Genes in Cancer

Marina Trombetta-Lima, Thiago Jacomasso, Sheila Maria Brochado Winnischofer, Mari Cleide Sogayar
Tumor Suppressor Genes: Functions, Regulation and Health Effects, Edition: 1st, Chapter: Divergent Roles for Tumor Suppressor Genes in Cancer, Publisher: NOVA Publishers, Editors: Mehmet Gunduz, Esra Gunduz.

Stem cells in embryonic skin development.

Maria F Forni, **Marina Trombetta-Lima**, Mari C Sogayar
Biological research 01/2012; 45(3):215-22. · **1.13 Impact Factor**

Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells.

Glaucio Valdameri, **Marina Trombetta-Lima**, Paulo R Worfel, Amanda R A Pires, Glaucia R Martinez, Guilhermina R Noleto, Silvia M S C Cadena, Mari C Sogayar, Sheila M B Winnischofer, Maria E M Rocha. . Chem Biol Interact. 2011 Sep 5;193(2):180-9

4. Prêmios e títulos

2013 Seleção para apresentação oral no evento, XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular

2012 Seleção para apresentação oral no evento, Sao Paulo Advanced School of comparative Oncology.

2010 Prêmio de melhor pôster apresentado no II Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química - USP, Instituto de Química - USP.

2010 Prêmio viagem do Instituto de Químíica –USP, para participar do congresso Keystone symposium: "New Insights into Healthspan and Diseases of Aging: From Molecular to Functional Senescence" Tahoe City – EUA

2010 Membro associado da American Association for Cancer Research, American Association for Cancer Research (AACR)

2009 Menção honrosa por poster apresentado no evento, X Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular e V International Symposium on Extracellular Matrix.

2008 Fellowship to foreign students - Molecular Biology of the Cell Course, Institut Pasteur, Institut Curie..

5. Resumos publicados em anais de congresso (selecionados de um total de 20)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RECK TUMOR AND METASTASIS SUPPRESSOR GENE ALTERNATIVE SPLICE VARIANTS: POTENTIAL BIOMARKERS FOR GLIOBLASTOMA MULTIFORME PROGNOSTIC **M Trombetta-Lima**, [1]ACO Carreira, [1]MAA Demasi, [4]B Wei,[1]C Colin, [3]SKNaMarie, [3]SM Oba-Shinjo, [4]W Stetler-Stevenson, [2]SMB Winnischofer, [1]MC Sogayar[*]. XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular, RJ, Brasil. 2013

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THREE NOVEL SPLICE VARIANTS OF THE *RECK* TUMOR AND METASTASIS SUPPRESSOR GENE: POTENTIAL BIOMARKERS FOR PROGNOSTIC IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME.M **Trombetta-Lima**, [1]ACO Carreira, [1]MAA Demasi, [4]B Wei,[1]C Colin, [3]SKNaMarie, [3]SM Oba-Shinjo, [4]W Stetler-Stevenson, [2]SMB Winnischofer, [1]MC Sogayar[*]. São Paulo advancend School of Comparative Oncology, São Paulo, Brasil. 2012

CHARACTERIZATION OF THREE NOVEL SPLICE VARIANTS THE *RECK* TUMOR AND METASTASIS SUPPRESSOR GENE. M **Trombetta-Lima**, [1]ACO Carreira, [1]MAA Demasi,[1]C Colin, [3]SKNaMarie, [3]SM Oba-Shinjo, [2]SMB Winnischofer, [1]MC Sogayar[*]. , FL, EUA. 2011.

Eventos Internacionais

Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR), 2011

Eventos Nacionais

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), nas edições de 2004, 2005, 2007, 2008, 2010 (Congresso)

Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular, nas edições de 2006 , 2008 e 2013 (Simpósio).

SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP), nas edições de 2006 e 2005

Experiencia como Supervisora/ Mentoria

Aluna: Thais de Assis Ribas

Análise do perfil de expressão das isoformas geradas por splicing alternativo do gene supressor de tumor RECK durante osteogênese de células-tronco mesenquimais de pele humana.

Bolsa CNPq com início em fev/2013

Aluno: Caio Vinicius Carriel Dalmasso

Modulação da expressão dos transcritos do gene supressor de tumor *RECK* pelo marcador de malignidade CD90 em modelo de carcinoma mamário humano.

Início em fev/2013

Supervisão compartilhada com a doutoranda Aline RM Lobba.

Aluna: Michelle Silberspitz Konig.
Análise do perfil de expressão das isoformas geradas por splicing alternativo do gene supressor de tumor RECK durante osteogênese de células-tronco mesenquimais de pele humana.
2010-2012
Bolsa CNPq

Aluna: Heloisa Neumann Nogueira.
Clonagem dos trancritos alternativos B, D e I do gene supressor de tumor RECK em modelo de expressão em bactérias BL21 DE.
2009 -2011
Bolsa Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.