UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LUCIANA RODRIGUES GOMES

**Papel de TGF- β 1 na regulação da expressão de
MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) em modelo
de carcinoma mamário humano: análise funcional
de RECK e sua correlação com dados clínico-
patológicos**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

08/09/2011

LUCIANA RODRIGUES GOMES

Papel de TGF- β 1 na regulação da expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) em modelo de carcinoma mamário humano: análise funcional de RECK e sua correlação com dados clínico-patológicos

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

Co-orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola

São Paulo

2011

À minha mãe querida, pelo seu incondicional empenho pela minha felicidade. Por sempre me ajudar a superar os momentos difíceis, por torcer por mim nos períodos de transformação e novos desafios, e por vibrar pelas minhas conquistas e alegrias. Definição de amor, carinho e alegria.

Ao meu pai, pela dedicação absoluta à minha educação e ao meu bem estar. Por ser meu grande exemplo de vida e perseverança. Por ensinar-me que o destino a nós pertence.

Aos meus queridos e eternos irmãozinhos, Caio e Mateus, maiores tesouros da minha vida. Pelas risadas, brincadeiras, amor e carinho.

Ao Leonardo, companheiro que quero para sempre ao meu lado, muito obrigada pelo amor, carinho, dedicação, compreensão, alegria e bom humor. Por fazer a minha vida mais leve e feliz.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, pelos oito anos de orientação. Pela confiança depositada em mim desde o início, e por ter apostado no meu crescimento. Por oferecer a oportunidade de trabalhar em um laboratório de excelência, permitir o convívio com profissionais e estudantes tão competentes e por fazer do nosso grupo uma grande família. Por apoiar minhas decisões e escolhas. Por ser um grande exemplo de força, determinação, simplicidade e humildade. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelo apoio e pela grande amizade!

À Profa. Dra. Leticia Labriola, pela co-orientação deste trabalho. Por ter me ensinado tanto sobre ciência e como praticá-la da melhor forma. Por todas as contribuições realizadas ao longo deste trabalho e, principalmente, por sua singular participação na minha formação. Por me ajudar a perseguir os meus objetivos e por sempre me apoiar. Pelo seu grande exemplo de profissionalismo. Muito obrigada pelo companheirismo, amizade e atenção!

À Profa. Dra. Mina Bissell do Lawrence Berkeley National Laboratory, pela orientação em meu estágio de Doutorado no exterior. Por me aceitar em seu laboratório e por permitir que eu fizesse parte de um dos mais importantes e consagrados grupo de pesquisa em câncer de mama. Por ter me dado a oportunidade de aprender tanto, e conhecer profissionais de tamanha excelência. Por seu grande exemplo como mulher e cientista.

"I am much obliged to Professor Mina Bissell for accepting me in her lab and for allowing me to be in one of the most important and recognized group in mammary gland research. I also thank for giving me the opportunity to learn so much, and meet so excellent professionals. Thanks for your great example as a woman and a scientist."

Ao Prof. Dr. André Fujita do Instituto de Matemática e Estatística da USP, pelas importantes e produtivas colaborações. Pela realização das análises estatísticas dos dados de *Tissue Microarray*, pela amizade, estímulo e exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, pela disponibilização das lâminas de *Tissue Microarray* e pela colaboração.

À Dra. Joni Mott do Lawrence Berkeley National Laboratory, por sua supervisão em meu estágio de doutorado no exterior. Pelos ensinamentos, paciência, dedicação e amizade. Por ter viabilizar minha excelente experiência no laboratório da Profa. Mina Bissell, sempre me ajudando e apoiando. Muito obrigada por tudo!

"I am much obliged to Dr. Joni Mott for teaching, patience, dedication and friendship. I also thank for allowing that my period of training in Mina Bissell Lab has been a so wonderful experience. Thanks for everything!"

À Ana Correa do Lawrence Berkeley National Laboratory, por me ajudar a suportar a saudade dos amigos e familiares, durante os meus seis meses de estágio na Califórnia. Muito obrigada pela amizade e pelos passeios por toda Bay Area.

À Joana, à Aninha e à Paula minhas querida amigas! Por tornarem o dia a dia da pós-graduação mais divertidos. Por sempre me apoiarem e se fazerem presentes, mesmo a longa distância, tanto nos momentos felizes quanto nos mais difíceis. Muito obrigada pela amizade!

À Lauren e ao Mateus, dois grandes amigos da Bioquímica, os quais quero levar para a vida toda.

À Juliana Velasco pela amizade e apoio nos momentos difíceis. Por ser uma amiga tão fiel, verdadeira e prestativa.

À Eliana e ao Zé Antônio, por serem os melhores sogros que alguém pode ter. À Amanda por sempre ser tão atenciosa comigo. Muito obrigada a todos vocês, por fazerem parte da minha nova família.

Ao Antero, por seu companheirismo. Pelas risadas, papos furados, e por me apresentar às festinhas da USP.

À Fernanda Festa, minha supervisora durante a iniciação científica, por apresentar-me à ciência e ensinar-me a amá-la. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, pelas broncas, paciência, carinho e amizade.

À Rita, pelo apoio no início deste trabalho e amizade.

Aos antigos membros do laboratório, que deixam muitas saudades: Sheila, Rita, Fê Festa, Christian Colin, Wagner, Antero, André Fujita, Angelita, Miguel, Nicole, Maya, Flávia, Carin, Ícaro, Patrícia Barros, Dona Helena, entre tantos outros. Muito obrigada pelo incentivo, troca de conhecimentos e pelo convívio.

À Nanda, por sua grande amizade ao longo destes quatro anos e meio de doutorado. Por todo seu apoio e exemplo de dedicação e profissionalismo. Muito obrigada por tudo!!!

À Tati, pela grande amizade e alegria contagiante. Por sempre estar disposta a organizar várias festinhas do Lab., e por tornar o ambiente de trabalho mais leve e feliz.

À Letícia Terra, pela contribuição direta a este trabalho, através da realização de alguns ensaios de *Western-blotting*. Pela várias consultorias relacionadas ao inglês e a informática. Pela amizade e conversas na copinha.

À Rosângela pela ajuda em alguns experimentos de *Western-blotting*. Por sempre estar disposta a contribuir. Pela sua energia e otimismo contagiante, e pelo seu grande exemplo de vida.

À Aline pela grande amizade. Pelas infinitas conversas na copinha, sobre os mais variados assuntos: casamento, academia, política, jogos, comida, futuro, blábláblá.

À Marina por estar ao meu lado desde o meu primeiro dia neste laboratório. Pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Gustavo por ser um grande amigo. Deixo claro que disse amigo e não padrinho, viu? Muito obrigada pela várias ajudas com o inglês. Agradeço também por sempre ter sido tão prestativo.

À Ana Lúcia pelas suas loucuras, que tornam o dia a dia do nosso laboratório mais divertido. Por ser tão verdadeira e direta.

À Roberta pela amizade. Por ser tão divertida e prestativa. Pelo seu exemplo de humildade e simplicidade. E muito obrigada também pelas várias caronas!

Aos meus grandes amigos do laboratório: Nanda, Tati, Aline, Lê Terra, Ana Lu, Gustavo, Marina, Erik, Roberta, Ilana, Paty Kossugue e Marluce. Pelas festinhas na casa da Tati e mil e uma idas ao japonês. Pelas brincadeiras, besteiras e bizarrices faladas, e por estas e infinitas outras frases inesquecíveis: *“É muito ruim ser irmão único”; “Pegue um frasco na geladeira... ele é bem alemão e pequeno”; “Esse ano a Sexta-feira Santa será num sábado”; “Têm umas meninas que não estão aqui e que eu nunca vi na minha vida”; “Eu não me importo de trabalhar de sábados, domingos e finais de semana.”*.

Vocês estarão para sempre em meu coração! Muito obrigada por tudo!!!

À Ana Cláudia por sempre ter todas as respostas. Grande oráculo do laboratório! Muito obrigada por sempre ter me ajudado. Por ter sempre me ajudado a resolver vários problemas, e pelas caronas!

Ao Marcos por sempre estar disposto a ajudar a todos. Pelo exemplo como profissional e grande amizade!

Aos Professores Anamaria Camargo, Fábio Forti e Maria Teresa Machini pela análise crítica deste trabalho e sugestões realizadas durante o exame de qualificação.

À Ana Cláudia, Katiúcia, Theri e Leticia Labriola pela revisão desta tese.

À Zizi, Débora, Sandra e Ricardo, grandes alicerces deste laboratório. Muito obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar, pela paciência, companheirismo e amizade.

Aos funcionários da Química, por sua competência e profissionalismo.

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

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

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

“A felicidade não está em fazer o que a gente quer e sim em querer o que a gente faz.”

“O homem não é nada mais do que aquilo que faz a si próprio.”

Jean-Paul Sartre

RESUMO

Gomes, L.R. **Papel de TGF- β 1 na regulação da expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) em modelo de carcinoma mamário humano: análise funcional de RECK e sua correlação com dados clínico-patológicos.** 2011. 207 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A causa de morte da maioria das pacientes com câncer de mama se deve à doença metastática desenvolvida a partir do tumor primário. A degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC), um dos principais eventos do processo metastático, é regulada pelo balanço entre as atividades das metaloproteinases de matriz (MMPs) e dos seus inibidores, tanto os inibidores teciduais (TIMPs) como o inibidor associado à membrana (RECK). Contudo, ainda existe pouca informação sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela manutenção deste balanço.

No presente trabalho, foi investigado o envolvimento de TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1), uma citocina multifuncional é capaz tanto de inibir o crescimento celular, quanto de promover invasão e metástase, dependendo do estadiamento e do tipo de tumor, na regulação da expressão de MMPs, TIMPs e RECK, em modelo de câncer de mama.

Primeiramente, examinou-se os níveis de expressão de mRNA das isoformas e receptores de TGF- β , em um painel de cinco linhagens de carcinoma mamário humano, com diferentes potenciais invasivos e metastáticos, por qRT-PCR. Os resultados obtidos demonstraram uma correlação positiva entre a expressão dessas moléculas, e a progressão do caráter invasivo e metastático celular.

Em seguida, a linhagem altamente invasiva, MDA-MB-231, foi tratada com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante. Esta citocina foi capaz de modular a expressão gênica de MMPs (MMP-2 e MMP-9) e de seus inibidores (TIMP-2 e RECK). Tanto ERK $\frac{1}{2}$, quanto p38MAPK mostraram-se envolvidas neste mecanismo. Foi demonstrado que a inibição da atividade de ERK $\frac{1}{2}$ alterou a expressão das proteínas MMP-9, TIMP-2 e RECK, enquanto o bloqueio de p38 MAPK afetou os níveis protéicos de MMP-2 e TIMP-2. O aumento do potencial migratório e invasivo da linhagem MDA-MB-231, induzido por TGF- β 1, mostrou-se também dependente da atividade de MMPs, ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK.

Dada a ausência de informações sobre o papel de RECK em modelo mamário, a função deste inibidor de MMPs também foi investigada. Primeiramente, analisou-se a expressão de RECK ao longo do desenvolvimento da mama e, posteriormente, em 1040 amostras tumorais de mama humana, através da metodologia de *Tissue Microarray*, tendo sido possível demonstrar que a alta expressão de RECK associa-se a menor tempo de sobrevida global e livre de doença em 10 anos.

Os resultados obtidos indicaram que a expressão da proteína RECK, em oposição ao verificado em outros tipos de tumores, está relacionada ao fenótipo mais agressivo de tumores de mama. Entretanto, a análise funcional de RECK, realizada por meio da utilização de vetores shRNA específicos para a inibição desta proteína, demonstrou que RECK também atua como um inibidor de invasão celular e da expressão de MMP-9, na linhagem MDA-MB-231.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para a elucidação dos mecanismos moleculares de regulação de RECK, por clássicas moléculas associadas ao processo de tumorigênese (TGF- β 1 e MAPKs), bem como

para o esclarecimento de suas funções em modelo mamário, sugerindo-o como mais um promissor candidato a marcador prognóstico e alvo molecular para a terapia do câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama, TGF- β 1, MMPs, TIMPs, RECK, invasão

ABSTRACT

Gomes, L.R. **Role of TGF- β 1 as a common regulator of MMPs and their inhibitors (TIMPs e RECK) in human breast cancer cell model: functional analysis of RECK and its correlation with clinical-pathological data.** 2011. 207 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The metastatic disease is the main mortality cause of breast cancer patients. The metastatic process involves a complex cascade of events, including the organized breakdown of the extracellular matrix (ECM) compounds. The degradation of ECM is tightly regulated by the balance between the activities of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors, the tissue inhibitors (TIMPs) and the membrane-associated inhibitor (RECK). Among the several molecules released and activated by ECM remodeling, TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) is a multifunctional cytokine able to regulate both cell growth inhibition and invasion and metastasis promotion, depending on the tumor stage and type.

Since the molecular mechanisms involved in the ECM remodeling control are still not completely understood, in this study, we investigated the involvement of TGF- β 1 in regulating of MMPs, TIMPs and RECK expression, in the breast cancer model. By qRT-PCR, we first examined the gene expression levels of TGF- β isoforms and receptors, in a panel of five human breast cancer cell lines displaying different degrees of invasiveness and metastatic potential. Our results suggest a positive correlation between the mRNA expression of these molecules and the breast cancer progression.

Moreover, the highly invasive breast cancer cell line MDA-MB-231 was treated with different concentrations of recombinant TGF- β 1. We described that this

cytokine was able to modulate the gene expression of MMPs (MMP-2 and MMP-9) and MMPs inhibitors (TIMP-2 and RECK) at both the mRNA and protein levels, with ERK $\frac{1}{2}$ and p38 MAPK being involved in this molecular mechanism. However, while ERK $\frac{1}{2}$ activity inhibition altered MMP-9, TIMP-2 and RECK expression, the p38 MAPK blockage affected the protein levels of MMP-2 and TIMP-2. Finally, we reported that the TGF- β 1-enhanced migration and invasion capacities of MDA-MB-231 cells were blocked by MMPs, ERK $\frac{1}{2}$ and p38 MAPK inhibitors.

Analysis of the RECK function in the breast model was also an objective of this study. We analyzed RECK expression during mammary gland development. We evaluated the RECK protein profile in 1040 breast tumor tissue samples using Tissue Microarray assays. We demonstrated that high expression levels of RECK were associated with shorter overall and disease-free survival in 10 years. Moreover, we verified that RECK is a biomarker of poor prognosis mainly for patients diagnosed with less aggressive breast tumor. Therefore, in contrast to other tumor types, our results indicate that high protein expression levels of RECK are related to a more aggressive phenotype. In fact, the RECK functional analysis, performed by using of shRNA vectors, showed that RECK function remains as an inhibitor of cellular invasion and MMP-9 expression, in MDA-MB-231 cells.

Taken together, our results contribute to better understanding of the molecular mechanisms associated to RECK regulation by TGF- β 1 and MAPK as well as to clarify its role in breast model. Thus, we suggests RECK as a new and promising prognostic marker and molecular target candidate for breast cancer therapy.

Keywords: breast cancer, TGF- β 1, MMPs, TIMPs, RECK, cellular invasion

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da glândula mamária.....	2
Figura 2: As principais etapas da cascata metastática.	9
Figura 3: Os domínios estruturais básicos comuns a todas as MMPs.....	12
Figura 4: Os múltiplos processos e mecanismos de sinalização celular regulados pela atividade de MMPs.....	13
Figura 5: Eventos celulares relacionados ao processo de progressão tumoral regulados pela atividade de MMPs.....	14
Figura 6: Estrutura primária da proteína RECK.....	17
Figura 7: Modelo proposto para a ação inibitória de RECK sobre MMPs.....	19
Figura 8: Perfil de expressão de RECK e MMPs ao longo da progressão tumoral.....	21
Figura 9: Formação da forma latente pequena e grande de TGF- β	23
Figura 10: Esquema representativo das vias de transdução de sinal envolvidas na mediação dos efeitos celulares de TGF- β	26
Figura 11: Análise dos níveis de expressão de mRNA de metaloproteinases de matriz em linhagens de carcinoma mamário humano, com potenciais de agressividade diferentes.	60
Figura 12: Análise dos níveis de expressão de mRNA de inibidores de metaloproteinases de matriz, em linhagens de carcinoma mamário humano com diferentes potenciais de agressividade.....	62
Figura 13: Análise dos níveis de expressão de mRNA das isoformas de TGF- β e de seus receptores, em linhagens de carcinoma mamário humano com diferentes potenciais de agressividade.....	66
Figura 14: Análise dos níveis de expressão gênica de PAI-1 na linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-231, tratada com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante.....	72
Figura 15: Análise dos níveis de expressão relativa de mRNA e proteína de MMPs, na linhagem MDA-MB-231 tratada com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante.....	74
Figura 16: Análise dos níveis de expressão relativa de mRNA e proteína de inibidores de MMPs, na linhagem MDA-MB-231 tratada com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante.....	76
Figura 17: Cinética de fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ na linhagem MDA-MB-231, tratada com TGF- β 1 recombinante por diferentes períodos de tempo.	78
Figura 18: Cinética de fosforilação de p38MAPK na linhagem MDA-MB-231, tratada com TGF- β 1 recombinante por diferentes períodos de tempo.	79
Figura 19: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína das MMPs moduladas por TGF- β 1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de ERK $\frac{1}{2}$	81
Figura 20: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína dos inibidores de MMPs modulados por TGF- β 1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de ERK $\frac{1}{2}$	83
Figura 21: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína das MMPs moduladas por TGF- β 1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de p38MAPK.....	86

Figura 22: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína dos inibidores de MMPs modulados por TGF- β 1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de p38MAPK.....	88
Figura 23: Análise da fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor específico para esta MAPK, e estimulada com TGF- β 1 recombinante por diferentes períodos de tempo.....	91
Figura 24: Análise da fosforilação de p38MAPK na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de ERK $\frac{1}{2}$ e estimulada com TGF- β 1 recombinante, por diferentes períodos de tempo.....	93
Figura 25: Análise da fosforilação de p38MAPK na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor específico para esta MAPK, e estimulada com TGF- β 1 recombinante por diferentes períodos de tempo.....	94
Figura 26: Análise da fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de p3MAPK, e estimulada com TGF- β 1 recombinante por diferentes períodos de tempo.....	95
Figura 27: Migração celular in vitro da linhagem MDA-MB-231 tratada com TGF- β 1 e/ou com inibidores ERK $\frac{1}{2}$, p38MAPK e MMPs.....	97
Figura 28: Invasão celular in vitro da linhagem MDA-MB-231 tratada com TGF- β 1 e com inibidores ERK $\frac{1}{2}$, p38MAPK e MMPs.....	98
Figura 29: Análise da expressão da proteína RECK em linhagens celulares epiteliais de mama normal de camundongo.	101
Figura 30: Análise da expressão gênica de β -caseína nas células EpH4, CID-9 e ScP-2, como controle positivo dos ensaios de diferenciação da glândula mamária, através de estímulo com hormônios.	102
Figura 31: Expressão de mRNA e proteína de RECK em ensaios de diferenciação da glândula mamária in vitro, nas células EpH4, CID-9 e ScP-2 estimuladas com hormônios.....	104
Figura 32: Análise da expressão de mRNA e proteína de RECK em amostras de mama murina em diferentes estágios do desenvolvimento (virgem, gestação, lactação e involução).....	106
Figura 33: Análise da expressão e localização da proteína RECK em amostras de mama de camundongas virgens (A) e lactantes (B).....	108
Figura 34: Padrão de marcação da proteína RECK nas amostras de tumores de mama incluídas nos ensaios de Tissue Microarray.....	110
Figura 35: Imagens de imunohistoquímica representativas do perfil de expressão da proteína RECK detectado em amostras teciduais de mama.	111
Figura 36: Curvas de Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) das pacientes diagnosticadas com tumores mamários, em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.	117
Figura 37: Curvas de Sobrevida Global (A e B) e Sobrevida Livre de Doença (C e D) das pacientes diagnosticadas com tumores mamários de baixo (A e C) e alto (B e D) grau, em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.	118
Figura 38: Curvas de Sobrevida Global das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores luminais, CK8 (A e B) e CK18(C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.....	120

Figura 39: Curvas de Sobrevida Livre de Doença das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores luminais, CK8 (A e B) e CK18(C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.....	122
Figura 40: Curvas de Sobrevida Global das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores basais, CK5,6 (A e B) e CK14 (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.....	123
Figura 41: Curvas de Sobrevida Livre de Doença das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores basais, CK5, 6 (A e B) e CK14 (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.....	125
Figura 42: Curvas de Sobrevida Global das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão dos biomarcadores p53 (A e B) e EGFR (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.....	127
Figura 43: Curvas de Sobrevida Livre de Doença das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão dos biomarcadores p53 (A e B) e EGFR (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de Tissue Microarray.....	128
Figura 44 – Níveis de expressão da proteína RECK em um painel de seis linhagens mamárias humanas, incluindo: células não tumorigênicas (S1), células não invasivas (MCF-7 e T47D) e linhagens invasivas (T4-2, MDA-MB-231 and Hs578T).	131
Figura 45: Expressão da proteína RECK em linhagens de mama normal (S1), tumoral (T4-2) e tumoral revertida (T4-2 tratada com Tyrphostin) cultivadas em monocamada (2D) e em três dimensões (3D).	133
Figura 46: Morfologia das linhagens de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 RECK deficientes geradas pela metodologia de RNA de interferência.....	135
Figura 47: Expressão de mRNA e proteína de RECK na linhagem MDA-MB-231 infectada com lentivírus recombinantes detentores de diferentes seqüência shRNA específicas para RECK (shRECK 23 a 27) ou uma seqüência controle shRNA scramble.....	137
Figura 48: Ensaios de invasão em Transwell™ para avaliação do potencial invasivo das células MDA-MB-231 deficientes para a expressão de RECK (shRECK 26) e controle scramble, na presença ou na ausência de um inibidor farmacológico de MMPs (GM6001).	138
Figura 49: Expressão de MMP-9 nas células MDA-MB-231 deficientes para a expressão de RECK (shRECK 26) e nas células controle infectadas com a seqüência scramble de shRNA.....	140
Figura 50: Análise do potencial proliferativo de células MDA-MB-231 RECK deficientes (shRECK 26) e controle scramble, através de ensaios de curva de crescimento e formação de colônia.	142
Figura 51: Esquema do mecanismo molecular proposto para a ação de TGF-β1 como um regulador comum da expressão de MMPs (MMP-2 e MMP-9) e seus inibidores (TIMP-2 e RECK), através das vias de sinalização mediadas por ERK½ e p38 MAPK, na linhagem MDA-MB-231..	154

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo	45
Tabela 2: Concentração final e eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica em células de carcinoma mamário humano, através de ensaios de RT-PCR quantitativo.....	58
Tabela 3: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores, em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	64
Tabela 4: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica das isoformas de TGF- β e a expressão de mRNA de MMPs, inibidores de MMPs e receptores de TGF- β , em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	68
Tabela 5: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica dos receptores de TGF- β e a expressão de mRNA de MMPs e seus inibidores, em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	70
Tabela 6: Correlação entre os dados clínicos e patológicos e o nível de expressão da proteína RECK detectado em amostras de tumores de mama, através de ensaios de <i>Tissue Microarray</i> ..	113
Tabela 7: Correlação entre o <i>status</i> de biomarcadores e o nível de expressão da proteína RECK detectado em amostras de tumores de mama, através de ensaios de <i>Tissue Microarray</i>	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CA	Califórnia
cDNA	DNA complementar
CDKIs	Inibidores de quinases dependentes de ciclina
CK	<i>Cytokeratin</i>
Co-Smads	Smads co-operacionais
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento de epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EMT	Transição epitélio-mesênquima (<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FAK	Quinase de Adesão Focal
GDFs	<i>Growth and differentiation factors</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Her-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HMBS	Hidroximetil bilane sintase (<i>hydroxymethyl bilane synthase</i>)
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase
hRECK	RECK de humano
Inca	Instituto Nacional de Câncer
I-Smads	Smads inibitórias
JNK	<i>JUN NH2-terminal kinase</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LL-TGF- β	Grande complexo latente de TGF- β
LTBP	Proteína de ligação à TGF- β latente
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MEC	Matriz extracelular
MIF	<i>Müllerian inhibitory factor</i>
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MN	Minnesota
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
MMP	Metaloproteinases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
NJ	New Jersey
Nm	Nanômetros
PBSA	Solução salina tamponada com fosfato – sem cálcio ou magnésio (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo
RE	Receptor de estrógeno
RECK	<i>Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RP	Receptor de progesterona
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute
R-Smads	Smads associadas ao receptor
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	<i>Reverse Transcription PCR</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SARA	<i>Smad anchor for receptor activation</i>
SBR	Sistema de classificação <i>Scarff-Bloom-Richardson</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Eletroforesis</i>
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	<i>Small harpin RNA</i>
SL-TGF-β	Pequeno complexo latente de TGF-β
Smad	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
SP	São Paulo
SLD	Sobrevida Livre de Doença
TBST	<i>Tris Buffered Saline Tween 20</i>

TBRI	Receptor de TGF- β do tipo I
TBRII	Receptor de TGF- β do tipo II
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
TIMP	Inibidor tecidual de MMPs (<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNM	Sistema de classificação baseado no: tamanho do tumor, nº linfodos comprometidos, presença de metástase

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O desenvolvimento da glândula mamária e a tumorigênese	1
1.2. O câncer de mama.....	3
1.3. A matriz extracelular e o processo metastático.....	7
1.4. As metaloproteinases de matriz (MMPs)	11
Figura 4: Os múltiplos processos e mecanismos de sinalização celular regulados pela atividade das MMPs.	13
1.5. Os Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz (TIMPs)	15
1.6. O gene supressor de metástase RECK.....	17
1.7. A citocina TGF- β 1	21
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Linhagens Celulares	32
3.2. Soluções e meios de cultura para células de mamífero	34
3.3. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares	35
3.4. Crescimento celular em três dimensões.....	36
3.5. Ensaio de curva de crescimento celular.....	37
3.6. Ensaio de formação de colônia	37
3.7. Ensaio de migração celular <i>in vitro</i>	38
3.8. Ensaio de invasão celular <i>in vitro</i>	39
3.9. Ensaio de diferenciação da glândula mamária.....	40
3.10. Tratamento da linhagem MDA-MB-231 com TGF- β 1 recombinante e inibidores farmacológicos para as proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK.....	41
3.11. Ensaio de atividade enzimática – Zimografia.....	41
3.12. Extração e purificação de RNA total de células de mamífero	42
3.13. Ensaio de RT-PCR quantitativo	43
3.13.1. Síntese de cDNA.....	43
3.13.2. Desenho dos <i>primers</i>	44
3.13.3. Determinação da concentração final de <i>primers</i>	46
3.13.4. Determinação da eficiência dos <i>primers</i>	46
3.13.5. Reação de RT-PCR quantitativo	47
3.13.6. Confirmação da expressão diferencial	48

3.14. Ensaio de Western-blot.....	50
3.14.1. Obtenção de extratos protéicos totais.....	50
3.14.2. Fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose.....	50
3.14.3. Imunoreação	51
3.15. Transdução por lentivírus.....	51
3.16. <i>Tissue Microarray</i>	53
3.17. Análise estatística dos dados	54
4. RESULTADOS	56
4.1. Regulação coordenada da expressão de MMPs e de seus inibidores por TGF- β 1, em modelo de câncer de mama.....	56
4.1.1. Expressão gênica de MMPs e de seus inibidores (TIMPs e RECK) em linhagens de carcinoma de mama humano com níveis de malignidade distintos.....	56
4.1.2. Correlação entre os níveis de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens de carcinoma de mama humano com níveis de malignidade distintos	63
4.1.3. Expressão gênica das isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e de seus receptores (T β RI e T β RII) em linhagens de carcinoma mamário humano, com diferentes capacidade invasivas.....	65
4.1.4. Correlação entre os níveis de expressão gênica das isoformas e receptores de TGF- β versus a expressão de mRNA de MMPs e seus inibidores, em linhagens de carcinoma de mama humano com níveis de malignidade distintos	67
4.1.5. Regulação da expressão gênica e protéica de MMPs e de seus inibidores (TIMPs e RECK) pelo tratamento com TGF- β 1 recombinante.....	71
4.1.6. Efeito de TGF- β 1 sobre a fosforilação das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK.....	77
4.1.7. Papel de ERK1/2 no mecanismo de regulação da expressão de MMPs e de seus inibidores por TGF- β 1	80
4.1.8. Função de p38MAPK no mecanismo de regulação da expressão de MMPs e de seus inibidores por TGF- β 1	84
4.1.9. Interação entre as vias de sinalização mediadas por ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK na linhagem MDA-MB-231.....	89
4.1.10. Papel de ERK $\frac{1}{2}$, p38 MAPK e MMPs no efeito de TGF- β 1 sobre o potencial migratório e invasivo da linhagem MDA-MB-231	96
4.2. RECK ao longo do desenvolvimento da glândula mamária.....	99
4.2.1. Expressão de mRNA e proteína correspondentes ao inibidor de MMPs associado à membrana (RECK) em ensaios de diferenciação de mama murina.....	99
4.2.2. Avaliação da expressão e localização de RECK em amostras de mama em diferentes estágios do desenvolvimento.....	104
4.3. Expressão de RECK em amostras de tumores de mama e seu poder prognóstico de sobrevida de pacientes.....	108

4.3.1. Detecção dos níveis de expressão protéica de RECK em ensaios <i>Tissue Microarray</i>	109
4.3.2. Relação entre a expressão de RECK e os dados clínico-patológicos dos tumores mamários analisados nos ensaios de <i>Tissue Microarray</i>	112
4.3.3. Relação entre a expressão da proteína RECK e a sobrevida das pacientes incluídas nos estudos de <i>Tissue Microarray</i>	116
4.4. Análise funcional de RECK em células de carcinoma mamário humano altamente invasivas	129
4.4.1. Expressão da proteína RECK em linhagens celulares de mama humana.....	129
4.4.2. Inibição da expressão de RECK, por meio da metodologia de RNA de interferência, na linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-231	134
4.4.3. Capacidade invasiva e expressão de MMP-9 em células MDA-MB-231 deficientes em RECK	137
4.4.4. Análise do crescimento celular da linhagem MDA-MB-231 RECK deficiente.....	141
5. DISCUSSÃO	144
5.1. TGF- β 1 como modulador comum da expressão de MMPs e seus inibidores	144
5.1.1. Correlação entre os níveis de expressão gênica de MMPs, TIMPs e RECK e a capacidade invasiva e metastática de linhagens celulares de carcinoma mamário humano.....	144
5.1.2. Expressão gênica das isoformas e receptores de TGF- β em linhagens de carcinoma de mama humano com graus de malignidade distintos	147
5.1.4. O mecanismo de regulação da expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) por TGF- β 1.....	151
5.2. Expressão de RECK ao longo do desenvolvimento da glândula mamária	155
5.3. Expressão de RECK como indicador de menor tempo de sobrevida de pacientes com câncer de mama	158
5.4. Análise funcional de RECK em câncer mama: modulação de MMP-9 e inibição de invasão celular	163
6. CONCLUSÕES	166
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	169
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171
LISTA DE ANEXOS	181

1. INTRODUÇÃO

1.1. O desenvolvimento da glândula mamária e a tumorigênese

A principal função da glândula mamária é prover leite ao recém nascido, tanto para sua nutrição como para sua proteção imunológica. Apesar do desenvolvimento da mama ser iniciado durante a formação do feto, no momento do nascimento esta glândula apresenta-se em estágio rudimentar. Portanto, diferentemente de outros órgãos, os principais eventos de diferenciação da glândula mamária, ocorrem após o nascimento (Lanigan et al., 2007). Os vários estágios de desenvolvimento pós-natal da mama, sucedidos durante a puberdade, gestação, lactação e involução, associam-se diretamente ao desenvolvimento sexual e reprodutivo da mulher (Lanigan et al., 2007; Sternlicht, 2006). A maior parte do conhecimento disponível sobre estes processos foram obtidos através da realização de experimentos e análises em modelos murinos, e então extrapolados para humanos (Lanigan et al., 2007, Dimri et al., 2005).

O epitélio mamário é organizado em duas camadas, formadas por células mioepiteliais e por células epiteliais luminais, responsáveis pela produção das proteínas do leite (Figura 1). As células mioepiteliais, localizadas no entorno das células luminais, conectam-se a lamina basal e regulam a polaridade celular (Keely, 2011, Dimri et al., 2005). Processos relacionados ao controle da secreção apical, expressão gênica, proliferação e apoptose são regulados pela adesão celular a matriz extracelular (MEC). Dessa forma, a adesão das células a lamina basal é essencial para

o desenvolvimento da glândula mamária, e para a manutenção da arquitetura e função desta glândula (Lanigan et al., 2007).

Figura 1: Estrutura da glândula mamária

A glândula mamária é composta por uma rede de ductos e lóbulos circundados por tecido adiposo e fibroblastos do estroma. Os dois principais tipos celulares presentes nos ductos mamários são as células mioepiteliais e as células luminais. As unidades terminais ductal-lobular e a putativa presença de células-troco progenitoras também são indicadas neste esquema (Adaptado de Dimri et al., 2005).

A susceptibilidade da glândula mamária à tumorigênese está intrinsecamente associada aos múltiplos ciclos de alterações morfológicas aos quais esta é submetida, em seu desenvolvimento normal, gerando diversas possibilidades para que o complexo mecanismo de remodelamento da glândula mamária seja alterado e resulte em malignidade. Muitos dos mecanismos de sinalização relacionados à

interação de células epiteliais mamárias com seu microambiente, nos seus vários ciclos da diferenciação, podem ser corrompidos por células tumorais, viabilizando sua elevada taxa proliferativa e sua disseminação para diferentes tecidos (Keely, 2011).

Foi demonstrado que a protease MMP-3 (Metaloproteinase de matriz 3) é capaz tanto de regular a morfogênese normal da mama, como também a formação de tumores. No tecido mamário normal, para a ramificação de seus ductos e invasão do tecido adiposo, tem-se a degradação da MEC e alta atividade de proteases, em várias fases de seu desenvolvimento pós-natal. Entretanto, estas mesmas moléculas e mecanismos estão também intrinsecamente associados à progressão tumoral mamária (Keely, 2011). Dessa forma, ao longo da transformação celular, as interações célula-célula e célula-matriz são alteradas, resultado em perda da arquitetura celular.

1.2. O câncer de mama

O câncer corresponde ao principal problema de saúde pública dos EUA, sendo a maior causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda em países em desenvolvimento (Jemal et al., 2011; Siegel et al., 2011). Atualmente, uma a cada quatro mortes são provocadas pelo surgimento de tumores, apesar da diminuição das taxas de incidência de neoplasias entre homens e mulheres nos EUA, desde 1998 (Siegel et. al, 2011).

Dentre os diversos tipos de câncer, o carcinoma mamário assume um papel de destaque, por ser o primeiro em incidência, entre as mulheres de todo o mundo.

Estima-se que 230.480 novos casos de câncer de mama serão diagnosticados nos EUA em 2011, correspondendo a 30% do total de novos casos de câncer entre as mulheres (Siegel et. al, 2011). Além disso, as taxas de mortalidade associadas ao desenvolvimento de tumores de mama são muito elevadas, sendo a segunda maior causa de morte provocada por câncer, entre as mulheres (Siegel et. al, 2011). Em contrapartida, as taxas de incidência de câncer de mama nos EUA diminuem cerca de 2% ao ano desde 1999, principalmente devido à redução do uso da terapia de reposição hormonal, bem como o maior acesso aos exames de mamografia (ACS, 2010).

De modo semelhante, grande é o impacto do câncer na saúde pública brasileira. Dados do Instituto Nacional de Câncer (Inca) estimam 489.270 novos casos de câncer por ano, para o período de 2010 e 2011 (Inca, 2010). O tipo de maior incidência entre as mulheres brasileiras, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, também é o tumor mamário, correspondendo 49 mil novos casos em 2010 (Inca, 2010). Perfil similar também é verificado em outros países da América Latina (Inca, 2010). O risco estimado de desenvolvimento do câncer de mama muda em função da localidade, variando de 65 novos casos a cada 100 mil mulheres na Região Sudeste para 17 casos por 100mil na Região Norte, correspondendo respectivamente, às áreas de maior e menor risco (Inca, 2010).

Quando diagnosticado e tratado em estágios iniciais da doença, o câncer de mama apresenta bom prognóstico. Entretanto, provavelmente devido a falhas na política de diagnóstico precoce, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil. A sobrevida média, após cinco anos do diagnóstico da

doença, é de 61% na população mundial, subindo para 73% nos países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento como o Brasil, a sobrevida média é reduzida para 57% (Inca, 2010).

Muitos são os fatores de risco de câncer de mama relacionados ao histórico reprodutivo e menstrual da mulher. A menarca precoce, nulidade, o uso de anticoncepcionais orais, idade da primeira gestação, menopausa tardia e a terapia de reposição hormonal, são fatores epidemiológicos bem estabelecidos para tumores mamários (Cui et al., 2009; de Waard e Thijssen, 2005; Inca, 2010). Alterações nos níveis hormonais são comuns a todos estes fatores de risco.

A expressão de receptores hormonais, principalmente, de estrógeno e progesterona, é essencial para a determinação do curso clínico da doença, bem como para determinação da terapia mais apropriada. A terapia hormonal adjuvante, principalmente por meio da administração de Tamoxifeno, é recomendada para mulheres cujos tumores expressam receptor de estrógeno (RE). Seus benefícios são potencializados quando combinada a quimioterapia, levando a redução significativa da recidiva da doença (1998; 2001; Aapro, 2001).

A expressão do receptor com atividade tirosina quinase do tipo 1, Her-2, também é um importante fator diagnóstico e prognóstico do câncer de mama (Milanezi et al., 2008; Ross e Fletcher, 1999; Slamon et al., 1987). Sua inibição consagrou-se como uma importante ferramenta no tratamento de tumores de mama (Brand et al., 2006). Para tanto, são utilizados anticorpos específicos ou inibidores de sua atividade tirosina-quinase, principalmente, pela administração dos fármacos Transtuzumab e Lapatinib (MacFarlane e Gelmon, 2011; De Santes et al., 1992). Por

sua vez, os tumores de mama classificados como triplo negativos (receptores de estrógeno, progesterona e Her-2 negativos), apesar de pouco frequentes (aproximadamente 15% dos casos de câncer de mama), provocam a morte de muitas mulheres. Além de altamente agressivos, a falta de uma terapia apropriada para pacientes diagnosticadas com este tipo de tumor, levam à sua alta taxa de mortalidade (Oakman et al., 2010).

Mais de 95% dos carcinomas de mama são originados no epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária (Yoder et al., 2007). Estes subtipos histológicos, ductal e lobular, podem apresentar-se tanto na forma de carcinoma in situ, no qual o tumor permanece confinado ao tecido mamário, quanto invasivo, atravessando os limites teciduais e disseminando-se para outros órgãos.

O sistema TNM é o principal método de classificação e estadiamento de tumores de mama. Este sistema fundamenta-se no tamanho do tumor (T), no número de linfonodos comprometidos (N) e na presença de metástase à distância (M). Baseados nestes critérios, os tumores são agrupados nos estádios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV (INCA, 2004). Além disso, outros fatores também devem ser analisados para a classificação histopatológica dos tumores de mama. Dentre estes, destaca-se a importância da determinação do grau histológico, através do sistema de classificação Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado. No grau de diferenciação SBR são analisados a formação de túbulos, atividade mitótica e pleomorfismo nuclear. A somatória desses fatores levam à classificação dos cânceres mamários em bem diferenciados (grau SBR 1), moderadamente diferenciados (grau SBR 2) e

fracamente diferenciado (grau SBR 3) (Filho et al., 2002; Junior et al., 2002; Le Doussal et al., 1989).

1.3. A matriz extracelular e o processo metastático

O desenvolvimento de metástase à distância apresenta-se como o principal fator associado à morte de pacientes com câncer de mama, assim como para a maioria dos pacientes com outros tipos de tumores sólidos. Tumores de mama diagnosticados e tratados quando ainda permanecem confinados ao tecido mamário, apresentam elevadas taxas de cura. Contudo, após sua extensão e colonização de sítios secundários, as taxas de sobrevida decaem significativamente (Bacac e Stamenkovic, 2008; Welch et al., 2000).

A metástase pode ser definida como o crescimento progressivo de células em um sítio que apresenta descontinuidade em relação ao tumor primário. Para tanto, ao longo de sua trajetória as células metastáticas devem ser capazes de, entre outras coisas, sobreviver ao estresse e ao dano físico, causados durante seu deslocamento na corrente sanguínea e, assim, subverter o microambiente e as condições adversas de sobrevivência e proliferação, encontradas nos tecidos a serem colonizados (Shibue e Weinberg, 2011). Para adquirir esta habilidade, um grupo especializado de células tumorais, provenientes da massa de tumor primário, deve ser capaz de completar a intrincada cascata de múltiplos estágios da metástase (Bacac e Stamenkovic, 2008; Vernon e LaBonne, 2004). Caso uma célula não consiga completar uma das etapas deste processo, não será considerada metastática. Dessa forma, dada a sua grande complexidade, o desenvolvimento de metástase ou

crescimento tumoral à distância é considerado um evento molecular tardio na progressão tumoral mamária.

Muitas são as etapas pelas quais as células tumorais devem passar até tornarem-se metastáticas (Figura 2). Primeiramente, para desprendimento da massa tumoral primária, estas células passam por uma série de alterações morfológicas e moleculares (conjuntamente denominada de Transição-Epitélio-Mesênquima, EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) que resultam na perda de polaridade celular, diminuição do contato célula-célula e aquisição de motilidade (Gomes et al., 2011; Vernon e LaBonne, 2004). As células metastáticas utilizam os vasos sanguíneos e linfáticos como vias de dispersão para outros tecidos. Para seu alcance, as células tumorais degradam a matriz extracelular e a membrana basal do tecido primário, migram, invadem o estroma circundante, e penetram nas vias de circulação mais próximas (intravasão) (Bacac e Stamenkovic, 2008; Shibue e Weinberg, 2011).

Figura 2: As principais etapas da cascata metastática.

(1) Transição epitélio-mesenquima, (2) degradação da membrana basal, migração celular e invasão do estroma, (3) invasão dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, transporte e extravasão celular, (4) proliferação celular e formação de novos tumores em sítios descontínuos ao tumor primário (Adaptado de Bacac e Stamenkovic, 2008).

Apesar de todas as adversidades, as células metastáticas sobrevivem dentro dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, extravasam ao alcançar o sítio secundário de colonização, adaptam-se às condições deste novo tecido ou subvertem seu microambiente de modo a acomodar suas necessidades. Finalmente, as células metastáticas proliferam e formam um novo tumor distante do tecido mamário

(Vernon et al., 2004; Bacac e Stamenkovic, 2007; Shibue e Weinberg, 2011). Devido à grande dificuldade e pressão seletiva verificada em cada uma dessas etapas da cascata metastática, metástases dormentes podem ser formadas. Deste modo, as células tumorais podem parar de crescer até adquirem ou obterem as condições necessárias para a continuidade deste processo (Figura 2).

Em muitas das etapas da metástase tumoral, faz-se necessária a degradação e interação das células tumorais com os componentes da matriz extracelular (MEC) (Bacac e Stamenkovic, 2008; Itoh e Nagase, 2002; Shibue e Weinberg, 2011). Esta estrutura dinâmica de macromoléculas atua como uma barreira física para a migração e invasão celular. Portanto, uma das características mais importantes das células metastáticas corresponde a sua capacidade de degradação da MEC.

Sabe-se que além de proporcionar suporte mecânico e integridade para os tecidos, a complexa rede formada pela interação entre os componentes da MEC (colágenos, fibras elásticas, glicoproteínas não-colagênicas e proteoglicanos) atua também como um “reservatório” de fatores de crescimento, citocinas, fatores angiogênicos e de diferenciação. Portanto, à medida que seus componentes são degradados e modificados, a MEC exerce um papel instrutivo liberando e/ou ativando importantes fatores, disponibilizando-os, assim, para interação com os receptores celulares (Egeblad and Werb, 2002; Klein and Bischoff, 2011; Nagase et al., 2006).

O remodelamento da MEC é parte integrante tanto de processos fisiológicos, quanto patológicos, como por exemplo, no desenvolvimento e na progressão tumoral, respectivamente (Klein e Bischoff, 2011). Devido à sua grande relevância e

espectro de atuação, a degradação da matriz extracelular é severamente controlada, por um complexo e bem coordenado conjunto de moléculas. O balanço estabelecido entre as atividades de proteases e seus inibidores, principalmente coordenado pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores, os inibidores teciduais (TIMPs) e o inibidor associado à membrana (RECK), são essenciais para a regulação do remodelamento da MEC (Meng et al., 2008; Nagase et al., 2006).

1.4. As metaloproteinases de matriz (MMPs)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são o principal grupo de enzimas responsáveis pelo remodelamento da MEC (Chakraborti et al., 2003). A primeira MMP descrita foi identificada devido à sua habilidade de degradar colágeno e hidrolizar caudas de girino (Gross and Lapiere, 1962). Até o presente momento, foram identificadas 23 MMPs em humanos, as quais, em conjunto, são capazes de degradar todos os componentes da MEC (Clark et al., 2008).

As MMPs contêm um domínio catalítico de aproximadamente 100 aminoácidos, detentor de um sítio de ligação a zinco e uma metionina conservada. A presença de íons zinco e cálcio, coordenados a este domínio, é essencial para a estabilidade, manutenção da estrutura tridimensional e desempenho da atividade enzimática das MMPs (Chakraborti et al., 2003). Muitas MMPs são secretadas, contudo, algumas delas apresentam um domínio transmembrana em sua estrutura, sendo expressas como enzimas de superfície celular. Estas moléculas são produzidas como precursores inativos, contendo uma porção próxima à região NH₂-terminal (ou pró-domínio) que deve ser removida ou modificada para conversão de sua forma

latente em ativa (Figura 3). O domínio hexopexina, presente na maioria das MMPs, influencia sua atividade, por meio da regulação da ligação aos substratos e aos inibidores de MMPs (TIMPs) (Egeblad and Werb, 2002; Nagase et al., 2006).

Figura 3: Os domínios estruturais básicos comuns a todas as MMPs.

Pré: pré-domínio ou peptídeo sinal, Pro: pró-domínio, Catalítico Zn: domínio catalítico e sítio de ligação ao íon zinco (Adaptado de Egeblad e Werb, 2002).

As MMPs são denominadas de acordo com uma nomenclatura numérica seqüencial. As MMPs secretadas são geralmente classificadas, de acordo com a especificidade ao substrato, em quatro grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e em um grupo heterogêneo contendo: matrilisinas (MMP-7), metalo-elastase (MMP-12), enamelisina (MMP-20), endometase (MMP-26) e epilisina (MMP-28). De acordo com esta classificação, as MMPs do tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) estariam reunidas em um grupo distinto (Klein e Bischoff, 2011).

Como consequência de sua função central no remodelamento da MEC, as MMPs são um dos principais moduladores do microambiente celular, pois também são capazes de processar inúmeras moléculas de superfície celular e proteínas pericelulares. Dessa maneira, as MMPs regulam processos associados às interações célula-célula e célula-matriz e, também, coordenam a liberação e/ou ativação de

moléculas sinalizadoras (fatores de crescimento, angiogênicos e quimioatrativos) eceptoras de sinal (receptores e outras proteínas de superfície celular), como TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1), por exemplo (Figura 4) (Sternlicht e Werb, 2001).

Figura 4: Os múltiplos processos e mecanismos de sinalização celular regulados pela atividade das MMPs.

Ação proteolítica das MMPs é capaz de alterar: as interações célula-célula e célula-matriz e a disponibilidade e a atividade de moléculas sinalizadoras e receptores de superfície celular (Adaptado de Sternlicht e Werb, 2001).

As interações célula-matriz são críticas para o desenvolvimento e a manutenção do equilíbrio de organismos em situações normais, mas também são imprescindíveis em processos patológicos. Portanto, muitos são os dados que evidenciam o importante papel das MMPs no remodelamento da MEC tanto em condições fisiológicas (embriogênese, cicatrização e processos inflamatórios),

quanto no desenvolvimento de doenças (artrite, doenças cardiovasculares e neoplasias) (Chakraborti et al., 2003).

A elevada atividade de MMPs é essencial para a execução de uma série de eventos da progressão tumoral (Figura 5). Dessa forma, correlações positivas têm sido observadas entre os níveis de expressão dessas enzimas e indicadores clínicos e patológicos de mau prognóstico nos mais variados tipos de tumor. Neste sentido, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e a MMP transmembrana do tipo I (MMP-14) destacam-se, entre os vários membros desta família de proteases, pois correspondem às MMPs mais freqüentemente relacionadas ao desenvolvimento de câncer (Kanazawa et al., 2010; Mook et al., 2004; Tetu et al., 2006; Turpeenniemi-Hujanen, 2005).

Figura 5: Eventos celulares relacionados ao processo de progressão tumoral regulados pela atividade de MMPs.

As MMPs são relacionadas a vários mecanismos moleculares associados à tumorigênese, dentre os quais: degradação da MEC, rompimento das adesões celulares, e indução de EMT, migração, invasão e angiogênese (Adaptado de Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010).

Especificamente em modelo mamário, os níveis séricos de MMP-9 são elevados em pacientes com tumores de mama, em relação aos níveis detestados em portadores de doença benigna e nos controles saudáveis. Altos níveis séricos de MMP-9 associam-se à presença de metástase no linfonodo, maior estadiamento do tumor e menor tempo de sobrevida global e livre de doença. Além disso, em amostras teciduais de tumores de mama, a alta expressão de MMP-9 também está relacionada com pior prognóstico da doença (Wu et al., 2008). De modo similar, maiores níveis de MMP-2 ativa em amostras tumorais de mama são correlacionados com os dados clínico-patológicos associados à pior curso clínico (Jezierska e Motyl, 2009; Shah et al., 2009). Por atuar como um importante fator no processo de ativação da MMP-2, níveis elevados de MMP-14 também estão relacionados ao pior curso clínico de pacientes com tumores de mama (Mimori et al., 2001).

1.5. Os Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz (TIMPs)

O controle da atividade de MMPs é muito relevante para a manutenção e o funcionamento normal do organismo, dado o amplo espectro de ação destas enzimas. Os mecanismos básicos de regulação de MMPs são realizados através do controle da: expressão gênica, ativação da pró-enzima e inibição direta de sua atividade enzimática mediada por inibidores específicos e/ou inespecíficos. Dentre os inibidores específicos das MMPs, destacam-se os inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs) que representam uma família de proteínas secretadas capazes de inibir, de modo reversível, a atividade proteolítica das MMPs

através da formação de complexos estequiométricos 1:1, não covalentes. Até o momento, quatro TIMPs foram caracterizados em humanos e outras espécies de mamíferos, sendo designados como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. (Brew et al., 2000; Lambert et al., 2004; Visse e Nagase, 2003).

Os TIMPs inibem a atividade de MMPs por um mecanismo comum de interação do seu resíduo cisteína N-terminal com o íon zinco presente no domínio catalítico das MMPs (Caterina et al., 1997; Lambert et al., 2004; Visse e Nagase, 2003). Além disso, os TIMPs podem modular a ativação de MMPs através de sua interação com as porções C-terminais das pró-MMPs.

Como consequência da ação inibitória de TIMPs sobre a atividade de MMPs, espera-se que altos níveis desses inibidores impeçam a progressão tumoral e que, desta forma, correlacionem com bom prognóstico para pacientes com câncer. No entanto, altos níveis de expressão de TIMPs têm sido observados em tecidos tumorais provenientes de pacientes em estádios clínicos avançados. Assim, elevada expressão de TIMP-2 e TIMP-4 é um indicador de pior prognóstico para pacientes com câncer de mama (Liss et al., 2009; Remacle et al., 2000). Da mesma maneira, altos níveis séricos de TIMP-1 relacionam-se a menor tempo de sobrevida livre de doença (Kuvaja et al., 2008; Wurtz et al., 2008).

Além de atuarem como inibidores de MMPs, vários estudos têm descrito uma ampla variedade de funções para os TIMPs. Como proteínas multifuncionais, estas moléculas são capazes tanto de suprimir, como de promover, a progressão tumoral, modulando processos celulares como: proliferação, apoptose e angiogênese, muitas vezes independentemente da sua ação sobre as MMPs (Lambert et al., 2004).

1.6. O gene supressor de metástase RECK

Na busca de novos alvos moleculares capazes de induzir a reversão fenotípica tumoral-normal da linhagem DT (células NIH-3T3 transformadas com o oncogene v-Ki-ras), o gene RECK foi isolado a partir do rastreamento de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano normal (Noda et al., 1989; Takahashi et al., 1998). Este gene foi mapeado no cromossomo 9p13, apresentando 21 exons e 20 introns, representando mais de 87kb do genoma humano (Eisenberg et al., 2002).

Na estrutura primária da proteína RECK humana (**R**eversion-inducing **c**ysteine-rich protein with **K**azal motifs), foram identificadas duas regiões hidrofóbicas, uma na porção NH₂-terminal, provavelmente associada à sua externalização, e, a outra, na porção COOH-terminal, como sinal para âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), por meio da qual RECK ancora-se à membrana plasmática (Takahashi et al., 1998) (Figura 6).

Figura 6: Estrutura primária da proteína RECK.

6-cys: motivo de cisteínas, SPI: inibidor de serina protease, GPI: glicosilfosfatidilinositol (Adaptado de Takahashi et al., 1998).

Além dos indícios preditos por meio da análise de sua estrutura primária, o tratamento de células com uma fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) reforça a hipótese de que RECK apresenta-se ancorado à membrana por GPI, dado a expressão desta proteína foi detectada somente no sobrenadante de células tratadas, e não nas células controle (Takahashi et al., 1998). Entretanto, todos estes indicativos foram obtidos indiretamente, e se mostraram inconclusivos devido à ausência da estrutura cristalográfica de RECK.

Até o presente momento, muitos são os indícios que sustentam o papel da proteína RECK como um potente inibidor de invasão celular, devido a sua ação como inibidor de metaloproteinases de matriz. Nos primeiros relatos, foi verificado que a expressão constitutiva de RECK nas linhagens de fibrosarcoma humano (HT1080) resultou na diminuição da secreção da pró-MMP-9 e inibição da liberação da MMP-2 ativa no sobrenadante da cultura, suprimindo, conseqüentemente, a atividade invasiva e metastática destas células (Oh et al., 2001; Takahashi et al., 1998).

Atualmente, sabe-se que RECK regula negativamente a atividade proteolítica da MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP), através de diferentes mecanismos (Figura 7) (Meng et al., 2008; Noda and Takahashi, 2007). No modelo proposto para a ação de RECK, tem sido sugerido que esta proteína ancorada à membrana plasmática, inibe as duas etapas de processamento proteolítico necessários para a ativação da pró-MMP-2. Dessa forma, RECK reprimiria a formação do complexo ternário constituído por MMP-14, TIMP-2 e pró-MMP-2, e também impediria a clivagem auto-proteolítica da MMP-2 intermediária, inibindo a formação da MMP-2 ativa (Noda and Takahashi, 2007; Rhee and Coussens, 2002) (Figura 7).

Além disso, tem sido proposto que RECK modularia MMP-9, principalmente através da inibição da secreção de sua pro-enzima e, mais recentemente, pela repressão de sua expressão gênica (Noda e Takahashi, 2007; Rhee e Coussens, 2002; Takagi et al., 2009). Por sua vez, os principais pontos de regulação de MMP-4 (MT1-MMP) por RECK são a inibição de sua atividade proteolítica sobre seus substratos e da formação do complexo ternário de ativação da MMP-2 (Figura 7) (Noda e Takahashi, 2007; Rhee e Coussens, 2002).

Figura 7: Modelo proposto para a ação inibitória de RECK sobre MMPs.

A proteína RECK é capaz de inibir a expressão e secreção de pro-MMP-9, a ativação proteolítica de MMP-2 e a atividade enzimática da MMP-14 (Adaptado de Noda e Takahashi, 2007).

Dada o amplo número de processos normais associados ao remodelamento da MEC e à atividade de MMPs, muitas são as potenciais ações de RECK em condições

fisiológicas. Por meio do *knock-out* gênico de RECK em camundongos, foi analisado o papel de RECK no desenvolvimento embrionário, tendo sido demonstrado que camundongos deficientes em RECK são inviáveis, morrendo no décimo dia de gestação, com deficiências na formação e na integridade de fibras de colágeno, desorganização da lâmina basal e desenvolvimento vascular comprometido. Tais características são muito similares às aquelas observadas em animais *knock-out* para MMP-2 (Oh et al., 2001). Além disso, mais recentemente, foi mostrado que RECK pode também estar relacionado ao desenvolvimento das junções neuromusculares (Kawashima et al., 2008).

Há pouco tempo, foi observado também que a inibição de RECK em células endoteliais humanas (HUVEC) levou à formação defeituosa de tubos vasculares e à senescência celular. A depleção de RECK foi acompanhada pela redução da ativação de $\beta 1$ -Integrina e da auto-fosforilação da Quinase de Adesão Focal (FAK), além do aumento da expressão do inibidor de quinase dependente de ciclina, p21. Estas observações sugerem que, além dos processos de invasão e metástase, RECK também é capaz de modular a proliferação celular (Miki et al., 2010; Winnischofer, manuscrito em preparação).

Os níveis de expressão de RECK vêm sendo associado a dados clínico-patológicos e de sobrevida de pacientes, em diferentes tipos de tumores. Em todos os modelos testados até o presente momento, níveis mais elevados de expressão gênica e/ou protéica de RECK correlacionam-se com o melhor prognóstico e maior tempo de sobrevida global e livre de doença (Clark et al., 2007; Furumoto et al., 2001; Masui et al., 2003). Dessa forma, a expressão de RECK é diminuída ao longo da progressão

tumoral, apresentando um perfil de expressão oposto àquele verificado para diversas MMPs (Figura 8) (Noda e Takahashi, 2007).

Figura 8: Perfil de expressão de RECK e MMPs ao longo da progressão tumoral.

(Adaptado de Noda e Takahashi, 2007)

O poder prognóstico de RECK foi avaliado em vários tipos de tumor, incluindo: carcinoma de pâncreas (Masui et al., 2003), hepatocarcinoma (Furumoto et al., 2001; Herold et al., 2002), carcinoma de pulmão (Pesta et al., 2009; Takemoto et al., 2007) e carcinoma colorectal (Takeuchi et al., 2004). Por sua vez, em modelo mamário, o perfil de expressão de RECK é controverso e ainda pouco estudado. Em amostras teciduais de tumores de mama, os níveis de mRNA de RECK são menores àqueles detectados nas amostras da borda normal adjacente (Span et al., 2003). Por outro lado, a expressão gênica de RECK mostrou-se aumentada em linhagens de carcinoma mamário humano com maior potencial invasivo e metastático (Figueira et al., 2009).

1.7. A citocina TGF- β 1

O primeiro membro da família dos TGFs foi descoberto no meio condicionado de fibroblastos infectados com vírus sarcoma murino, pela sua atividade transformante, induzindo o crescimento de células independentemente de ancoramento (de Larco and Todaro, 1978). Nos primeiros relatos, foi descrito que

esta resposta foi devida a atividade de dois fatores de crescimento distintos, nomeados TGF- α e TGF- β (Anzano et al., 1982; Anzano et al., 1983). Atualmente, sabe-se que estas moléculas possuem divergências e induzem efeitos celulares e teciduais substancialmente diferentes (Hyytiäinen et al., 2004).

A super família de TGF- β (Transforming growth factor beta) compreende um grande número de fatores, estrutural e funcionalmente relacionados, que atuam como reguladores multifuncionais num vasto espectro de processos biológicos (Santibanez et al., 2011). Através do controle do crescimento, diferenciação, adesão, migração e invasão celular, os membros da família de TGF- β então implicados na morfogênese, desenvolvimento embrionário, diferenciação de células troco adultas, resposta imune, cicatrização, inflamação e câncer (Santibanez et al., 2011).

Os 40 membros da super família de TGF- β , descritos até o presente momento, podem ser divididos em várias subfamílias: TGF- β s, BMPs (Bone morphogenetic proteins), GDFs (Growth and differentiation factors), MIF (Müllerian inhibitory factor) e activinas ou inibinas (Hyytiäinen et al., 2004). Além de compartilharem similaridades estruturais, todas estas proteínas são secretadas como dímeros, ligados por ponte dissulfeto (Hyytiäinen et al., 2004).

As três isoformas maduras de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) são proteínas de 25kD, formadas pela dimerização de dois peptídeos de 12,5kDa, derivadas de um polipeptídeo de 55kDa. Após sua síntese, estes dimerizam rapidamente e são processados proteoliticamente por uma furina protease, produzindo o fator de crescimento maduro e um pro-peptídeo (porção N-terminal). Este pro-peptídeo, denominado peptídeo associado à latência (LAP), permanece associado à proteína

madura por ligações não covalentes. Este complexo, designado pequeno complexo latente, (SL-TGF- β), liga-se covalentemente à proteína de ligação à TGF- β latente (LTBP), formando o grande complexo latente de TGF- β (LL-TGF- β) (Figura 9) (Hyytiäinen et al., 2004). Esta grande estrutura é então secretada e associada aos elementos da matriz extracelular (MEC).

Figura 9: Formação da forma latente pequena e grande de TGF- β .

TGF- β é sintetizado como uma molécula precursora contendo o fator de crescimento maduro na porção C-terminal (25kDa) e um pro-peptídeo associado à sua latência (75-80kDa). O complexo TGF- β latente grande (LL-TGF- β), formado pela ligação de TGF- β maduro a LAP e posteriormente a LTBP, permite o seqüestro do fator de crescimento TGF- β , por meio da ligação à MEC (Adaptado de Hyytiäinen et al., 2004).

Apenas após seu processamento e liberação estas moléculas podem interagir com seus receptores ou mediar seus efeitos. Assim, as isoformas de TGF- β sinalizam através de respostas celulares ativadas por receptores de superfície celular, com atividade quinases serina-treonina, denominados receptores de TGF- β do tipo I e II (TBRI e TBRII) (Hyytiainen et al., 2004; Massague, 2000; Shi and Massague, 2003). Após a ligação do dímero de TGF- β maduro ao seu receptor tipo II (T β RII), este se associa ao receptor tipo I (T β RI) e cataliza a fosforilação do seu domínio rico em glicina/serina, produzindo o complexo ligante-receptor ativo, capaz de modular seus efeitos intracelulares (Santibanez et al., 2011). A família das Smads compreende as principais proteínas responsáveis pela transdução do sinal de TGF- β (Heldin et al., 1997). Os membros desta família são bastante conservados, podendo ser classificados em três grupos: R-Smads (Smads associadas ao receptor), Co-Smads (Smads co-operacionais) e I-Smads (Smads inibitórias) (Santibanez et al., 2011; Qin et al. 2001; Qin et al., 2002).

Dessa forma, o complexo ligante-receptor ativado transduz seu sinal para o interior da célula através da fosforilação de R-Smads em seu domínio C-terminal. As R-Smads não fosforiladas são transcricionalmente inativas, permanecendo seqüestradas no citoplasma, através da ligação à moléculas específicas, como por exemplo, a proteína SARA (Smad anchor for receptor activation). Em humanos, foram identificadas cinco R-Smads (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8), sendo Smad2 e Smad3 substratos para os receptores de TGF- β e activinas, e Smad1, Smad5 e Smad8 mediadores do sinal induzido por BMPs, GDFs e MIFs (Santibanez et al., 2011. Miyazawa et al., 2002). Posteriormente, as fosfo-R-Smads associam-se à

Smad4 (Co-Smad), migram para o núcleo, onde, em colaboração com outros fatores de transcrição, ligam-se às regiões promotoras de vários genes alvos e regulam suas respectivas expressões (Shi e Massague, 2003; Massague, J, 2000; Santibanez et al., 2011; Qin et al. 2001; Qin et al., 2002).

Além desta via de sinalização transcricional, foi demonstrado que TGF- β pode também sinalizar através de vias independentes de Smad, principalmente através das MAPKs (Mitogen-actived protein kinases) ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2), JNK (c-jun N-terminal kinase) e p38 (Figura 10) (Giehl et al., 2007; Nagaraj e Datta, 2010). Sabe-se que a ativação das vias de MAPKs é um freqüente evento na tumorigênese, relacionando-se à degradação da MEC, aumento do potencial migratório e invasivo de células tumorais, bem como à inibição de morte e indução de crescimento celular (Reddy et al., 2003). Diversos relatos sugerem que a atividade promotora de tumor de TGF- β inclui não somente os sinais mediados por Smads, mas, também, aqueles transduzidos pelas vias de sinalização independentes de Smads. Dessa forma, a combinação dos sinais mediados pelas vias dependentes e independentes de Smads determinaria as respostas celulares a TGF- β .

Figura 10: Esquema representativo das vias de transdução de sinal envolvidas na mediação dos efeitos celulares de TGF- β .

TGF- β maduro liga-se a seu receptor do tipo II, associa-se ao receptor do tipo I e catalisa sua fosforilação. Este complexo ligante-receptor ativo gera alterações na expressão gênica através da transdução de seu sinal por vias de sinalização Smad-dependentes e Smad-independentes (ERK, JNK e p38) (Adaptado de Giehl et al., 2007).

Após a ligação do dímero de TGF- β maduro ao seu receptor tipo II (T β RII), este se associa ao receptor tipo I (T β RI) e cataliza a fosforilação do seu domínio rico em glicina/serina, produzindo o complexo ligante-receptor ativo, capaz de modular seus efetores intracelulares (Santibanez et al., 2011). A família das Smads compreende as principais proteínas responsáveis pela transdução do sinal de TGF- β (Heldin et al., 1997).

TGF- β é considerada uma molécula de dupla função no processo de progressão tumoral, pois atua tanto como um inibidor de crescimento celular, em

estágios precoces de desenvolvimento do tumor, como na promoção de invasão e metástase, em estágios mais tardios. Dessa forma, por serem dependentes de contexto e específicas para cada tipo celular, as respostas a TGF- β podem ser completamente opostas: inibição ou indução de crescimento, apoptose e diferenciação (Jakowlew, 2006).

Consistente com seu papel antitumoral, TGF- β pode limitar a proliferação celular através da indução dos inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKIs) p15 (INK4B) e p21(WAF1) e da repressão do oncogene *c-myc*. TGF- β também é capaz de reprimir a expressão de Id1, Id2 e Id3, fatores nucleares implicados na transição entre as fases G1-S do ciclo celular. Além de seu papel na regulação da progressão do ciclo celular, TGF- β pode também inibir o crescimento tumoral através da regulação da resposta à apoptose. Sua ação na indução de apoptose já foi descrita para uma grande variedade de tipos celulares, contudo, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo permanecem não elucidados (Jakowlew, 2006; Meulmeester and Ten Dijke, 2011).

Em relação ao seu papel pró-tumoral, TGF- β é descrito como o principal indutor de transição epitélio-mesenquima (EMT), processo característico de eventos fisiológicos, mas também essencial para o desenvolvimento de metástase à distância (Gomes et al., 2011; Meulmeester e Ten Dijke, 2011). A ação de TGF- β é crucial no processo metastático, tanto nos eventos iniciais de invasão e intravasão, como durante processos tardios, relacionados à extravasão e formação de colônias tumorais (Meulmeester e Dijke, 2011). Neste sentido, foi demonstrado que TGF- β 1, uma das três isoformas de TGF- β identificadas, atua na indução da expressão de

MMP-2 e MMP-9 em células epiteliais humanas de mama, além de regular estas e outras metaloproteinases de matriz em outros modelos celulares (Gomes et al., 2011; Kim et al., 2004). Além da modulação de EMT, invasão e disseminação celular, TGF- β também pode contribuir para a progressão tumoral por meio de indução da evasão do sistema imune (Meulmeester e Dijke, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O melhor entendimento dos mecanismos moleculares associados à regulação de moléculas chave do processo metastático, bem como o esclarecimento de suas funções em modelo mamário, poderá contribuir significativamente para a elucidação do processo de progressão tumoral. Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram:

- a)** Investigar o papel de TGF- β 1 na regulação coordenada da expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) em modelo de carcinoma mamário humano.
- b)** Analisar a expressão de RECK ao longo do desenvolvimento da glândula mamária.
- c)** Avaliar o perfil de expressão protéica de RECK em amostras de tumorais mamárias humanas, e sua correlação com dados clínicos, patológicos e de sobrevida das pacientes.
- d)** Realizar a análise funcional de RECK em células invasivas de carcinoma mamário humano.

2.2. Objetivos específicos

a) Papel de TGF- β 1 na regulação coordenada da expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) em modelo de carcinoma mamário humano

- 1)** Analisar a expressão gênica de MMPs (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) e inibidores de MMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK) em painel de linhagens celulares de câncer de mama, que apresentam potenciais de agressividade distintos.
- 2)** Avaliar os níveis de expressão mRNA das isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e seus receptores (T β RI e T β RII) em linhagens de carcinoma mamário humano, com diferentes níveis de capacidade invasiva.
- 3)** Estudar a modulação da expressão gênica e protéica de MMPs, TIMPs e RECK, pelo tratamento com TGF- β 1 recombinante.
- 4)** Investigar o envolvimento das vias de ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK na transdução do sinal de regulação de MMPs e seus inibidores, induzidos por TGF- β 1.
- 5)** Analisar o papel de ERK $\frac{1}{2}$, p38 MAPK e MMPs na modulação do potencial migratório e invasivo, mediados pelo tratamento com TGF- β 1.

b) RECK ao longo do desenvolvimento da glândula mamária

- 1)** Analisar a modulação da expressão de mRNA e proteína de RECK em ensaios de diferenciação de mama murina.
- 2)** Avaliar a expressão e localização de RECK em amostras de mama em diferentes estágios do desenvolvimento.

c) RECK em amostras tumorais de mama humana

- 1) Avaliar a expressão e localização de RECK em cortes histológicos de mama normal e tumoral, em diferentes estádios clínicos.
- 2) Analisar em larga escala o perfil de expressão protéica de RECK, em amostras de carcinomas de mama, através da técnica de *Tissue Microarray*.
- 3) Correlacionar os níveis de expressão de RECK, em amostras de tumores de mama, aos dados clínico-patológicos, além da sobrevida global e livre de doença, das pacientes.

d) Análise funcional de RECK em células invasivas de carcinoma mamário humano

- 1) Avaliar a expressão protéica de RECK em painel de linhagens celulares de mama, com malignidades distintas.
- 2) Analisar a expressão de RECK em modelos de cultura de mama em três dimensões.
- 3) Gerar células MDA-MB-231 com níveis de expressão da proteína RECK reduzidos, pela metodologia de RNA de interferência.
- 4) Avaliar o papel de RECK na capacidade invasiva das linhagens RECK negativas geradas, bem como a influência da atividade de MMPs neste processo.
- 5) Analisar alterações no potencial proliferativo das células MDA-MB-231 RECK deficientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens Celulares

293T: linhagem de rim embrionário humano, derivada de células HEK 293 transformadas com o antígeno *large T* de SV-40, apresenta alta eficiência de transfecção (DuBridge et al. 1987).

CID-9: linhagem celular epitelial de mama murina, correspondente a uma sub-população de células enriquecida para a expressão de β -caseína, isolada a partir da linhagem COMMA-1D (Schmidhauser et al., 1990).

Eph4: linhagem celular epitelial de mama murina, não tumorigênica, imortalizada espontaneamente (Fialka et al., 1996).

HMT3522 S-1: linhagem celular epitelial de mama humana, não maligna, derivada da linhagem HMT-3522, obtida de uma mamoplastia redutora, EGF dependente. Foi gentilmente cedida pela Profa. Mina J. Bissell (Laurence Berkeley National Laboratory, CA, EUA) (Rizki et al., 2008).

HMT3522 T4-2: linhagem celular epitelial de mama humana, maligna, derivada de tumores formados pela inoculação da linhagem HMT3522 S-2 em camundongos imunodeficientes. É independente de EGF para seu crescimento. Foi gentilmente cedida pela Profa. Mina J. Bissell (Laurence Berkeley National Laboratory, CA, EUA) (Rizki et al., 2008).

Hs578T: linhagem celular epitelial derivada de um carcinoma ductal mamário humano, receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP) negativa, invasiva e metastática, proveniente da ATCC (número ATCC: HTB-126). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 74 anos (Hackett et al., 1977).

MCF-7: linhagem celular epitelial derivada de um adenocarcinoma mamário humano, número ATCC: HTB-22. É positiva para os receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e pouco invasiva e metastática, tendo sido adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 69 anos (Soule et al., 1973).

MDA-MB-231: linhagem celular epitelial derivada de um adenocarcinoma mamário humano, número ATCC: HTB-26, RE e RP negativa, invasiva e metastática, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai (Faculdade de Medicina, USP). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 51 anos (Cailleau et al., 1978).

MDA-MB-435: linhagem celular epitelial derivada de um carcinoma ductal mamário humano, número ATCC: HTB-129, RE e RP negativa, invasiva e metastática, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Anamaria Camargo (Instituto Ludwig, Brasil). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 31 anos (Cailleau et al., 1978).

SCP-2: linhagem celular epitelial de mama, isolada a partir de uma cultura heterogênea da glândula mamária murina, de um animal durante a gestação (Desprez et al., 1993).

T47-D: linhagem celular epitelial derivada de um carcinoma ductal mamário humano, número ATCC: HTB-133, RE e RP positiva, pouco invasiva e metastática, gentilmente cedida pela Profa. Mina J. Bissell (Laurence Berkeley National Laboratory, CA, EUA). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 54 anos (Keydar et al., 1979).

ZR-75-1: linhagem celular epitelial derivada de um carcinoma ductal mamário humano, RE e RP positivas, pouco invasiva e metastática, proveniente da ATCC (número: CRL-1500). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 63 anos (Engel et al., 1978).

3.2. Soluções e meios de cultura para células de mamífero

Meios de cultura:

DMEM: (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

RPMI: (desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*) (Life Technologies).

H14: DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*, Life Technologies) com aditivos (250ng/mL de Insulina, 10µg/mL de Transferrina, 2.6ng/mL de Selenito de sódio, 10^{-10} M de Estradiol, $1,4 \times 10^{-6}$ M de Hidrocortisona, 5µg/mL de Prolactina e 10ng/mL de EGF).

Soluções:

Solução salina: PBSA (*Phosphate Buffered Saline* – sem cálcio ou magnésio), solução salina tamponada pH 7,2, composta por NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8mM e KH₂PO₄ 1,5mM.

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

Solução Versene: EDTA 5mM (pH 8,0) em PBSA.

Suplementos:

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

3.3. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos descartáveis adequados para o cultivo de células. O pH e a temperatura foram mantidos próximos à faixa fisiológica através de incubação em atmosfera de 2% CO₂/98% ar à 37°C. As linhagens HMT-3522 S-1 e T4-2 foram mantidas em meio H14 sem suplementação com SFB ou antibiótico. As células HMT-3522 T4-2 foram cultivadas em frascos previamente revestidos com colágeno tipo I (Vitrogen 100, Celtrix Laboratories, Palo Alto, CA, EUA). As outras linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura específico, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1,2 g/L de bicarbonato de sódio, ampicilina e estreptomicina. O meio de cultura foi renovado a cada 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.

As células correspondentes à série HMT-3522 (S-1 e T4-2) foram congeladas em solução contendo 10% glicerol, 15% SFB e 75% DMEM/F12 na concentração de 1,5x10⁶ células S-1/mL e 0,75x10⁶ células T4-2/mL. Os estoques referentes aos outros tipos celulares foram mantidos nos respectivos meios de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) estéril. As células, em seus meios de congelamento correspondentes, foram transferidas para a ampola de congelamento (NUNC) e incubadas por 15min 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 linhagens 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. As células foram centrifugadas a 800rpm (centrífuga de Bancada Baby®I, Modelo 206 BL, FANEM, Guarulhos, SP, Brasil) por 5min. Posteriormente, o sobrenadante, contendo DMSO, foi removido, os sedimentos celulares foram ressuspensos no meio de cultivo apropriado e mantidos em estufa com atmosfera de 2%CO₂ e a 37°C.

Todas as linhagens celulares utilizadas neste estudo foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma hominis*, por reações de PCR.

3.4. Crescimento celular em três dimensões

Além do tradicional cultivo em monocamada sobre frascos plásticos, as células HMT-3522 S-1 e T4-2 foram cultivadas em três dimensões. Alíquotas de membrana basal reconstituível livre de fatores de crescimento (Growth Factor reduced BD Matrigel™ - Basement Membrane Matrix, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA) foram mantidas em gelo para descongelamento. Utilizando-se ponteiras e placas resfriadas à 4°C, os frascos de cultivo foram preparados adicionando-se 0,5mL de Matrigel™ em placas de 35mm de diâmetro, evitando-se a formação de bolhas. As placas foram incubadas à 37°C por 20min para gelificação do Matrigel™. Posteriormente, 2.5×10^5 células HMT-3522 S-1 e 1.75×10^5 células T4-2 foram plaqueadas, num volume de 0,5mL de meio H14. Após 2min, para a sedimentação celular, adicionou-se, lentamente, por gotejamento, 0,5mL do mesmo meio de cultivo (H14) suplementado com 10% de Matrigel™. Para a reversão tumoral-normal das

células HMT-3522 T4-2, adicionaram-se 100nM do inibidor farmacológico de EGFR (Tyrphostin AG1478, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) ao meio de cultivo. Em seguida, as células foram mantidas em estufa à 37°C, com atmosfera de 2% de CO₂, por 4 dias, trocando-se o meio de cultivo no segundo dia.

3.5. Ensaio de curva de crescimento celular

Foram plaqueadas 5x10³ células/cm² das linhagens MDA-MB-231 scramble e shRECK, em meio de cultura RPMI suplementado com 10% soro, sobre placas de 35mm de diâmetro. As placas foram mantidas em condições adequadas de cultura, sendo o meio renovado a cada dois dias. Cada uma das linhagens celulares foi coletada 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o plaqueamento, em triplicata. Para tanto, as placas foram lavadas com PBSA e posteriormente incubadas com 0,4mL de solução de tripsina. Após alguns segundos, as células foram removidas da superfície das placas por meio da adição de 0,5mL de PBSA. Em seguida, as células foram fixadas por meio da adição de 0,1mL de formaldeído 37% filtrado, e mantidas a 4°C até o momento da contagem. O número de células presente nas suspensões foi determinado com o auxílio de hemocitômetro.

3.6. Ensaio de formação de colônia

Para os ensaios de formação de colônia, foram plaqueadas 1x10³ células MDA-MB-231 scramble e RECK deficientes, em placas de 35mm de diâmetro. Estas foram mantidas em cultura por 9 dias, renovando-se seu meio de cultura (RPMI suplementado com 10% soro) a cada 3 dias. Após este período de tempo, o número

de colônias formadas foi contado. Para isso, as células foram fixadas e coradas, utilizando-se a solução de Coomassie Blue (Sigma-Aldrich) 0,125% em Metanol:Ácido Acético:Água (45:10:45, v/v/v) (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA). Realizou-se triplicata para cada uma das condições experimentais, em três experimentos independentes.

3.7. Ensaio de migração celular *in vitro*

O potencial migratório da linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-231, submetida a diferentes condições de tratamento, foi analisado através de ensaios de migração *in vitro*, utilizando-se insertos de cultura celular do tipo Transwell™ (BD Bioscience). Os insertos utilizados apresentam uma membrana de PET com poros de 8mm de diâmetro. Previamente ao ensaio de migração, as células foram carenciadas para soro, em meio RPMI suplementado com 0,2% SFB, por, aproximadamente, 18h. Após este período, as células foram coletadas utilizando-se solução Versene, centrifugadas a 800g (centrífuga de Bancada Baby®I, Modelo 206 BL, FANEM) por 5min, ressuspensas em meio RPMI 0,2% SFB e contadas com o auxílio de hemocítmetro. Adicionaram-se 750µL/poço de meio RPMI suplementado com 10% SFB em placa de 24 poços. Posteriormente à inserção dos Transwells™ em cada um dos poços, adicionou-se 500µL de meio RPMI contendo 0,2% SFB e 1×10^4 células, sobre as membranas porosas.

Após 8h, os insertos foram retirados da placa de 24 poços. As células que não migraram neste período foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão (Cotonete®) e papel absorvente. Posteriormente, as células que

atravessaram a membrana porosa do Transwell™ foram fixadas e coradas em solução de Coomassie Blue (Sigma-Aldrich) 0,125% em Metanol:Ácido Acético:Água (45:10:45, v/v/v) (Merck) por 15min. O excesso de corante foi retirado lavando-se os insertos com água Milli-Q®. Após a secagem, as células foram contadas em microscópio invertido (Nikon, modelo Eclipse TE 300, Tokyo, Japão) utilizando-se lentes objetivas de 10x. Foram contadas as células presentes em três campos representativos de cada um dos insertos (mínimo de 60 células por campo). Realizou-se duplicata para cada uma das condições experimentais em três experimentos independentes.

3.8. Ensaio de invasão celular *in vitro*

A capacidade invasiva da linhagem MDA-MB-231 tratada com TGF- β 1 e transduzida com vetores lentivirais carreadores das seqüências de shRNA (*scramble* e shRECK), foi analisada através de ensaios de invasão *in vitro* utilizando-se insertos do tipo Transwell™ revestidos com MATRIGEL® (BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber, BD Bioscience). Para a re-hidratação da membrana basal reconstituível contida nos insertos, adicionaram-se 500 μ L de meio RPMI sem soro fetal bovino no interior de cada Transwell™ e nas placas de p24 poços, as quais foram incubadas por pelo menos 2h a 37°C em atmosfera de 2% CO₂.

As células submetidas aos ensaios de invasão foram carenciadas e obtidas de maneira semelhante àquele realizado nos ensaios de migração celular (item 3.7). Após a reconstituição do MATRIGEL® presente nos insertos, o meio para re-hidratação foi removido. Em seguida, RPMI suplementado com 10% SFB foi

adicionado à placa de 24 poços (750µL/poço). Foram plaqueadas 1×10^4 células sobre cada uma das membranas porosas, em meio RPMI contendo 0,2% SFB. Interrompeu-se a invasão celular 24h após o plaqueamento. As células remanescentes na porção superior do Transwell™, bem como o MATRIGEL®, foram removidos com auxílio de Cotonete® e papel absorvente. Posteriormente, as células presentes na parte inferior do inserto foram fixadas, coradas e contadas conforme previamente descrito no item 3.7.

3.9. Ensaios de diferenciação da glândula mamária

Foram plaqueadas 3×10^5 células/cm² correspondentes às linhagens de mama murina EpH4, CID-9 e SCP-2, em meio de cultura DMEM/F12 livre de soro fetal bovino, sobre placas de 35mm de diâmetro. Decorridas 24h, o meio de cultivo foi substituído por 2mL do meio de diferenciação, acrescido de 2% de MATRIGEL® (BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber, BD Bioscience). O meio de diferenciação foi preparado adicionando-se 50µg/mL de Gentamicina, 1µg/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 5µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e 3µg/mL de prolactina (Sigma-Aldrich), ao meio de cultura DMEM/F12 (Life Technologies). Estas células foram coletadas para extração de RNA e proteína, 48h após o estímulo com o meio de diferenciação, conforme respectivamente descrito nos itens 3.12 e 3.14 dos Materiais e Métodos. A expressão de mRNA de β -caseína foi utilizada como controle positivo deste ensaio.

3.10. Tratamento da linhagem MDA-MB-231 com TGF- β 1 recombinante e inibidores farmacológicos para as proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK

Foram plaqueadas 3×10^4 células/cm² correspondentes a linhagem MDA-MB-231, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Decorridas 48h, estas células foram carenciadas para soro, pela substituição do meio de cultivo por RPMI 0.1% SFB. Após um período de 12 à 18h, adicionaram-se 10ng/mL TGF- β 1 recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), por 20h. Foram testados os efeitos do tratamento com 1, 5 e 10ng/mL desta citocina sobre a expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK), para a definição desta concentração,

Foram utilizados os inibidores químicos PD98059 (Tocris, Bristol, Reino Unido) e SB203680 (Tocris), para a inibição da atividade das quinases ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK, respectivamente. Neste sentido, as células foram pré-tratadas por 1h com 5, 10 ou 20 μ M de PD98059 ou SB203680. Após este período de tempo, foi iniciado o tratamento das células MDA-MB-231 com TGF- β 1 recombinante.

Após 24h de tratamento, as células foram coletadas para extração de RNA e proteína, conforme descrito nos itens 3.12 e 3.14. Por sua vez, para a análise da atividade enzimática de MMPs, por ensaios de Zimografia (itens 3.11), foram coletados os meios condicionados destas células após 48h de tratamento com TGF- β 1.

3.11. Ensaio de atividade enzimática – Zimografia

As atividades *in vitro* das proteases MMP-2 e MMP-9, em suas formas ativas e de pró-enzima, foram avaliados por meio da realização de ensaios de Zimografia. As

amostras de meio condicionado, provenientes de células MDA-MB-231 submetidas a diferentes condições de tratamento, foram 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 descorados, até a obtenção do melhor contraste para visualização das bandas formadas, em solução aquosa de 40% Metanol (Merck) e 10% ácido acético (Merck). A atividade gelatinolítica foi visualizada através da formação de bandas não coradas com Coomassie. As imagens geradas por meio do escaneamento dos géis foram invertidas. A intensidade de cada banda foi quantificada por densitometria, utilizando-se o programa computacional ImageQuant 5.2 (GE HealthCare), e normalizadas pelo número de células. Para cada uma das condições estudadas, foram realizados quatro experimentos independentes em duplicata.

3.12. Extração e purificação de RNA total de células de mamífero

O RNA total das linhagens de mama humana utilizadas neste trabalho foi isolado utilizando-se colunas de sílica e metodologia disponibilizados pelo RNeasy® mini-kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para tanto, 3×10^4 células/cm² foram plaqueadas

em placas de 100mm 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. Para tanto, determinou-se a absorbância das preparações a 260nm, 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_{260nm}/Abs_{280nm} , tendo-se, como pureza satisfatória, uma relação próxima de 2,0.

3.13. Ensaio de RT-PCR quantitativo

3.13.1. Síntese de cDNA

Amostras de RNA total, extraídas conforme descrito no item 3.12, foram utilizadas como molde para a síntese de cDNA, em reações de transcrição reversa. Aliquotas de 1µg de RNA total, provenientes das linhagens celulares em diferentes condições de tratamento, foram previamente incubadas por 10min à 37°C, com 2µL de DNase I (1U/µL, Fermentas), em solução contendo 2µL de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Life Technologies) e 0,5µL de RNase OUT™ (40U/µL, Life Technologies) em volume final de 10µL. Posteriormente, esta enzima foi inativada por aquecimento à 75°C por 10min. A cada amostra de RNA previamente tratado foram adicionados 1µL de Oligo dT (0,5µg/µL, Life Technologies) e 1µL de dNTP (10mM, Life Technologies), obtendo-se um volume final de reação de 12µL. Em seguida, as amostras foram incubadas à 65°C por 10min, para desnaturação das moléculas, e imediatamente colocadas no gelo. Após alguns

minutos, adicionaram-se 8µL de uma solução contendo 2µL de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Life Technologies), 2µL de DTT (0,1M, Life Technologies), 0,5µL de RNase OUT™ (40U/µL, Life Technologies), 1µL da enzima SuperScript™ III (200U/µL, Life Technologies) e 2,5µL de água Milli-Q®, para um volume final de reação de 20µL. As amostras foram incubadas à 25°C por 10min, para anelamento dos *primers* e, posteriormente, à 50°C por 2h, para síntese dos cDNAs. Em seguida, a enzima transcriptase reversa foi inativada por meio da incubação das amostras a 72°C por 10min. Para a degradação das moléculas de RNA molde, adicionou-se 1µL de RNase H (5U/µL, Fermentas). As amostras foram incubadas a 37°C por 30min e, posteriormente, a 72°C por 10min, para inativação da enzima. Posteriormente, as amostras foram diluídas 3 vezes em água Milli-Q®.

3.13.2. Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes expressos nos experimentos de RT-PCR quantitativo foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primer Express* versão 3.0 (Life Technologies). 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, os pares de iniciadores foram desenhados em exons diferentes de cada um dos genes analisados (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo

Gene	Sequência do oligonucleotídeo (5' - 3')
MMP-2	F: AGCTCCCGGAAAAGATTGATG R: CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT
MMP-9	F: CACGCACGACGTCTTCCA R: AAGCGGTCCTGGCAGAAAT
MMP-14	F: GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA R: TCGAACATTGGCCTTGATCTC
TIMP-1	F: CCGCAGCGAGGAGTTTCTC R: GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA
TIMP-2	F: CGACATTTATGGCAACCCTATCA R: GGGCCGTGTAGATAAACTCTATATCC
TIMP-3	F: ATCACCTGGGTTGTAAGTCAA R: CGCTCCAGAGACACTCGTTCTT
RECK	F: TGCAAGCAGGCATCTTCAAA R: ACCGAGCCCATTTCATTTCTG
TGF- β 1	F: GGCCCTGCCCCTACATTT R: CCGGGTTATGCTGGTTGTACA
TGF- β 2	F: TCAAGAGGGATCTAGGGTGGA R: GGCARGCTCCAGCACAGAA
TGF- β 3	F: CAGCTCTAAGCGGAATGAGCAG R: TATAGCGCTGTTTGGCAATGTG
T β RI	F: AAGTCATCACCTGGCCTTGGT R: TGCGGTTGTGGCAGATATAGAC
T β RII	F: AATATCCTCTGAAGAACGACCTAA R: TCCCACCTGCCCACTGTTA
PAI-1	F: GGCTGACTTCACGCGTCTTTCAG R: GTTCACCTCGATCTTCACTTTCTG
GAPDH	F: ACCCACTCCTCCACCTTTGA R: CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
HMBS	F: TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT R: CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC
HPRT	F: TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG R: GGCCTCCCATCTCCTTCATC

3.13.3. 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 proveniente de diferentes linhagens de carcinoma mamário humano. Desta forma, determinou-se a menor concentração final de *primer* necessária para a amplificação do produto de interesse, sem que houvesse variação no valor do Ct e do perfil da curva de amplificação gênica, além da mínima ou inexistente formação de dímeros, em relação às obtidas para as maiores concentrações analisadas.

3.13.4. Determinação da eficiência dos *primers*

Reações de amplificação, contendo *primers* numa concentração ideal, foram realizadas utilizando-se, como *template*, uma mistura de cDNAs provenientes de diferentes linhagens de carcinoma mamário humano diluídas em série. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logarítmo 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:

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

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

3.13.5. 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 520nm. 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 PCR em tempo real.

Como molde, foram utilizados 3µL do cDNA (sintetizado conforme descrito no item 3.13.1) diluído 30 vezes em água Milli-Q®. Além disso, para cada uma das reações de RT-PCR quantitativo, adicionou-se 3µL do conjunto de *primers* (*forward* e *reverse*), na concentração final previamente determinada, e 6µL do reagente SYBR® *Green Dye*. Todas estas reações de PCR foram realizadas em triplicata, no termociclador 7300 *Real-Time PCR System* (Life Technologies). As condições das reações foram: 50°C por 2min (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase, AmpEraser), 95°C por 10min (etapa de ativação da enzima DNA Polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C de 15seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1min (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* (Life Technologies).

3.13.6. 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 (T_m) 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 T_m s, 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 C_t da amostra (*Threshold cycle*, ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*). Desta forma, para determinação do C_t 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 ΔC_p . O cálculo do ΔC_p 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:

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

3.14. Ensaio de Western-blot

3.14.1. 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 ressuspensionado 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 ressuspensionado 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 o 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.

3.14.2. 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).

3.14.3. 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 4°C. 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).

3.15. Transdução por lentivírus

Para a inibição da expressão de RECK foi utilizada a metodologia de RNA de interferência, por meio da transdução de células MDA-MB-231 com vetores letivirais, detentores de seqüências shRNA específicas para a inibição desta proteína. Foram

testados cinco seqüência de shRNA distintas para inibição de RECK (shRECK23, shRECK, 24, shRECK25, shRECK26 e shRECK27). Como controle, foram geradas células transduzidas com a seqüência de shRNA *scramble*. Os vetores de expressão para as seqüências shRNA RECK e shRNA *scramble*, além dos vetores estruturais (pLp1, pLp2 e pLp/VSVS) utilizados, fazem parte do sistema Mission® shRNA (Sigma-Aldrich).

Com este intuito, foram geradas as partículas virais recombinantes, por meio da transfecção da linhagem empacotadora 293FT. Para cada uma das construções de interesse, foi utilizada uma placa de 100mm de diâmetro de células 293FT em alta confluência celular (80-90%). O reagente de transfecção utilizado (Fugene 6, Roche Bioscience, Palo Alto, CA, EUA) foi incubado a temperatura ambiente, em 1mL de meio DMEM/F12, por 5min. Posteriormente, adicionaram-se a esta solução 4µg do vetor de interesse (shRECK ou shRNA *scramble*) e 1,3µg de cada um dos vetores estruturais. Esta mistura foi homogeneizada e incubada, a temperatura ambiente, por um 30min. Decorrido este período de tempo, esta solução foi adicionada às células 293FT. O meio de cultura destas células foi renovado, aproximadamente, 12h após este procedimento, e mantido por 48h. As partículas virais presentes neste meio condicionado foram concentradas, por ultracentrifugação a 25000rpm, por 90min, utilizando-se a ultracentrífuga Beckman L7, aliquotadas e conservadas em ultrafreezer a -70°C.

Para a infecção da linhagem MDA-MB-231, foram plaqueadas 1×10^4 células/cm² em placas de 35mm de diâmetro. No dia seguinte ao plaqueamento, foi trocado o meio de cultura e adicionado 4µg/mL de polibreno. Decorridas 1h, foram

acrescentados 20µL das partículas virais concentradas. Após a incubação das células MDA-MB-231 com os lentivírus recombinantes, por um período de 16 à 18h, o meio de cultura foi renovado. A seleção das células transduzidas foi realizada pela adição de 2µg/mL de puomicina. A escolha esta concentração de antibiótico foi previamente determinada por meio da exposição das células parentais MDA-MB-231 a diferentes concentrações de puomicina (1 a 10µg/mL).

3.16. *Tissue Microarray*

Para o ensaio de *Tissue Microarray* (TMA) foram avaliados um total de 1040 casos de carcinoma de mama humano provenientes do Banco de Tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Os blocos de parafina foram selecionados, retrospectivamente, dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo. O grupo de patologia do Laboratório de Anatomia Patológica, coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, foi responsável pela seleção dos blocos e montagem das lâminas.

Cada um dos 1040 casos de carcinoma de mama avaliados, representados por ao menos três amostras independentes, foram distribuídos em 12 lâminas de TMA. Estas lâminas foram submetidas a ensaios de imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-RECK (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA). As lâminas foram escaneadas, por meio da utilização do equipamento ScanScope XT. Nas imagens geradas utilizadas para a avaliação da expressão da proteína RECK nas amostras de tumor de mama, a porcentagem de células com marcação positiva para

RECK, presente na massa tumoral, foi determinada por meio do Spectrum Plus. Consideraram-se marcação negativa para RECK as amostras quantificadas com positividade inferior a 10%. Por sua vez, tumores quantificados com positividade igual ou superior a 10%, foram classificados como positivos para a expressão da proteína RECK. O valor de positividade para RECK utilizado nas análises estatísticas, foi o correspondente ao maior valor detectado entre as amostras de cada um dos casos.

O levantamento dos dados clínico-patológicos referentes às pacientes foi realizado através da análise dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do hospital. Para as análises de sobrevida global e livre de doença em 10 anos, foram excluídos os dados de expressão de RECK das amostras de pacientes com sobrevida superior a este período, remanescendo 748 casos dos 1040 totais avaliados.

3.17. Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística realizada com auxílio do programa computacional GraphPad Prism versão 4.0. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. 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 dispare e não enquadradas ao perfil distribuição normal. Testes de correlação de Spearman foram aplicados nas análises de correlação. Todas as análises estatísticas dos dados gerados pelos ensaios de *Tissue Microarray* foram realizadas utilizando a ferramenta R (<http://www.r-project.org/>), e supervisionadas pelo Prof. Dr. André Fujita (IME-USP). O teste do Qui-Quadrado foi utilizado nas análises de associação de variáveis qualitativas. Nas análises de sobrevida utilizou-se o método de Kaplan-Meier e o teste estatístico de Logrank. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Regulação coordenada da expressão de MMPs e de seus inibidores por TGF- β 1, em modelo de câncer de mama

Resultados anteriores do nosso laboratório indicaram uma correlação positiva entre os níveis de expressão gênica de MMPs, TIMPs e RECK, ao longo da progressão tumoral mamária humana, sugerindo a existência de um fator comum envolvido na regulação destes genes (Figueira et al., 2009). Os resultados apresentados a seguir, suportam o papel de TGF- β 1 neste processo.

4.1.1. Expressão gênica de MMPs e de seus inibidores (TIMPs e RECK) em linhagens de carcinoma de mama humano com níveis de malignidade distintos

Os dados de expressão de mRNA de MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 e RECK, previamente determinados pelo nosso grupo (Figueira et al., 2009), foram gerados utilizando-se RNA total extraído de amostras teciduais de tumores de mama. Além disso, os níveis de expressão gênica destas moléculas também foram avaliados num painel de cinco linhagens de carcinoma mamário humano, com distintas capacidades invasivas e metastáticas, mantidas em cultura por três e cinco dias (Figueira et al., 2009). Conforme demonstrado na dissertação de mestrado de Rita de Cássia Sávio Figueira, estas linhagens apresentam densidades de saturação e tempos de dobramento distintos. Logo, estas células atingem níveis de confluência celular diferentes, após o mesmo período de tempo em cultura.

Como Bachmeier e colaboradores demonstraram que, em modelo mamário humano, alguns membros das famílias das MMPs e dos TIMPs são diferencialmente

expressos em linhagens celulares cultivadas em densidades distintas (Bachmeier et al., 2005). No presente trabalho, nós avaliamos os níveis de expressão de mRNA de MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK em cinco linhagens celulares de câncer de mama, com níveis de malignidade diferentes, mantidas em cultura até atingirem 80-90% de confluência.

As amostras de RNA total extraídas das linhagens de mama pouco invasivas (MCF-7 e ZR-75-1) e muito invasivas (MDA-MB-231, MDA-MB435 e Hs578T), em confluências celulares similares, foram extraídas conforme descrito no item 3.12 dos Materiais e Métodos. Os ensaios de RT-PCR quantitativo foram realizados utilizando-se *primers* específicos para cada um dos genes de interesse (Tabela 1). As eficiências e concentrações ótimas de amplificação desses iniciadores, determinadas de acordo com as instruções dos itens 3.13.4 e 3.13.3, respectivamente, são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração final e eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica em células de carcinoma mamário humano, através de ensaios de RT-PCR quantitativo.

Iniciador	Concentração (nM)	Eficiência (%)
MMP-2	600	100
MMP-9	200	92
MMP-14	100	101
TIMP-1	400	94
TIMP-2	600	94
TIMP-3	200	113
RECK	600	114
TGF- β 1	400	105
TGF- β 2	600	94
TGF- β 3	600	81
T β RI	600	85
T β RII	600	115
PAI-1	400	100
HPRT	200	86
HMBS	200	109
GAPDH	200	92

Os resultados de qRT-PCR (Figuras 11, 12 e 13) representam os valores médios obtidos, em triplicata, correspondentes a três experimentos independentes realizados. Os dados de expressão gênica relativa foram calculados utilizando-se a linhagem MCF-7, como referência. Os níveis de expressão relativa, correspondentes aos genes GAPDH, HPRT e HMBS, foram submetidos ao programa computacional GeNorm para determinação do melhor controle endógeno (Vandesompele et al., 2002). Os níveis de GAPDH foram classificados como menos estáveis, em comparação aos de HPRT e HMBS, portanto, para o cálculo do Fator de Normalização GeNorm, foram usados apenas os valores de expressão gênica de HPRT e HMBS. Todos os resultados de expressão gênica relativa apresentados a seguir (Figuras de

11 a 16 e de 19 a 22) utilizam este Fator de Normalização como controle endógeno das reações de qRT-PCR.

Os níveis de expressão relativa de MMP-2 e MMP-14 mostraram-se, de modo geral, mais elevados nas linhagens mais agressivas (MDA-MB-231, MDA-MB-435 e Hs578T) em comparação às células não invasivas (MCF-7 e ZR-75-1) (Figura 11). A expressão gênica de MMP-2 apresentou-se significativamente aumentada nas linhagens de mama MDA-MB-435 ($p<0.05$) e Hs578T ($p<0.001$) em relação à MCF-7 (Figura 11). De modo similar, os níveis de mRNA de MMP-14 apontaram superexpressão estatisticamente significativa nas células de carcinoma mamário MDA-MB-231 ($p<0.05$) e Hs578T ($p<0.01$) (Figura 11).

Por sua vez, o perfil de expressão gênica de MMP-9 apresentou um padrão oposto ao das outras MMPs analisadas, mostrando-se reduzido nas células de caráter invasivo e metastático (MDA-MB-231, MDA-MB-435 e Hs578T) em relação às menos agressivas (MCF-7 e ZR-75-1) (Figura 11). Dessa maneira, os níveis mRNA de MMP-9 foram significativamente menores na MDA-MB-435 ($p<0.05$) quando comparada às células MCF-7 (Figura 11).

Figura 11: Análise dos níveis de expressão de mRNA de metaloproteinases de matriz em linhagens de carcinoma mamário humano, com potenciais de agressividade diferentes.

Ensaio de qRT-PCR foram realizados para análise dos níveis de expressão mRNA de MMPs (MMP-2, MMP-9 e MMP14) em um painel de cinco linhagens de carcinoma mamário humano, com distintas capacidades invasivas e metastáticas. As amostras de RNA total foram extraídas quando estas células atingiram confluência celular de 80-90%. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn's. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, todos versus o controle (MCF-7).

De modo geral, as linhagens celulares de caráter mais invasivo e metastático (MDA-MB-231, MDA-MB-435 e Hs578T) apresentaram maior expressão gênica relativa dos inibidores de metaloproteinases de matriz analisados (TIMP-1, TIMP-2,

TIMP-3 e RECK), em relação às linhagens pouco invasivas e não metastáticas (MCF-7 e ZR-75-1) (Figura 12). Assim, a linhagem Hs578T apresentou valores de expressão de mRNA de TIMP-1 ($p < 0.001$) e TIMP-3 ($p < 0.001$) significativamente mais elevados, quando comparada aos níveis verificados na linhagem MCF-7 (Figura 12). Além disso, TIMP-2 mostrou-se significativamente superexpresso nas células MDA-MB-435 ($p < 0.01$) e Hs578T ($p < 0.01$) (Figura 12). De maneira semelhante, o inibidor de MMPs associado à membrana, RECK, apresentou valores relativos de expressão de mRNA, significativamente maiores, nas células MDA-MB-435 ($p < 0.01$) e Hs578T ($p < 0.001$), em relação a linhagem MCF-7 (Figura 12).

Em conjunto, estes resultados (Figuras 11 e 12) demonstram que as linhagens de carcinoma mamário humano muito invasivas (MDA-MB-231, MDA-MB435 e Hs578T) expressam níveis mais altos de MMPs (MMP-2 e MMP-14) e de seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK), em comparação às células de mama pouco invasivas (MCF-7 e ZR-75-1).

Figura 12: Análise dos níveis de expressão de mRNA de inibidores de metaloproteinases de matriz, em linhagens de carcinoma mamário humano com diferentes potenciais de agressividade.

Ensaio de qRT-PCR foram realizados para análise dos níveis de expressão mRNA de inibidores de MMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK) em um painel de cinco linhagens de carcinoma mamário humano, com distintas capacidades invasivas e metastáticas. As amostras de RNA total foram extraídas quando estas células atingiram confluência celular de 80-90%. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn's. **, $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, todos versus o controle (MCF-7).

4.1.2. Correlação entre os níveis de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens de carcinoma de mama humano com níveis de malignidade distintos

A partir dos resultados obtidos através dos ensaios de RT-PCR quantitativo, foi possível avaliar a existência de uma correlação entre os níveis de expressão de mRNA de metaloproteinases de matriz (MMP-2, MMP-9 e MMP-14), e os níveis de expressão de seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK), em função do potencial invasivo e metastático das linhagens de carcinoma mamário humano analisadas. Para tanto, os dados de expressão gênica relativa de cada um destes genes, analisados nas linhagens de mama pouco invasivas (MCF-7 e ZR-75-1) e muito invasivas (MDA-MB-231, MDA-MB435 e Hs578T), mantidas em cultura até atingirem confluências celulares similares, foram submetidos à análise estatística de Correlação de Spearman.

Foi verificada a existência de uma correlação positiva, estatisticamente significativa ($p < 0.05$), entre os níveis de expressão gênica de MMPs (MMP-2 e MMP-14) e de seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK), em células tumorais de mama (Tabela 3). A exceção a este perfil de correlação positiva entre MMPs, TIMPs e RECK, foi observado para os dados de expressão de mRNA de MMP-9. Dessa forma, a expressão de MMP-9 correlacionou-se negativamente com os dados de expressão gênica de MMP-2 ($p = 0.0006$), MMP-14 ($p < 0.0001$), TIMP-1 ($p < 0.0001$), TIMP-2 ($p < 0.0031$), TIMP-3 ($p < 0.0001$) e RECK ($p < 0.0001$) (Tabela 3).

Em conjunto, estes resultados (Tabela 3) indicam uma correlação positiva entre os níveis de mRNA de MMPs (MMP-2 e MMP-14) e de seus inibidores (TIMP-1,

TIMP-2, TIMP-3 e RECK), a medida que aumenta a capacidade invasiva das linhagens de carcinoma mamário analisadas.

Tabela 3: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores, em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

Os valores de p foram obtidos após submissão dos dados de expressão relativa de mRNA, obtidos através de ensaios de RT-PCR quantitativo, ao teste de correlação de Spearman. Foram utilizados os dados correspondentes aos três experimentos independentes de qRT-PCR, realizados em triplicata. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$), (n) o número de amostras analisadas e (r) o coeficiente de Spearman.

Teste de correlação de Spearman		r	p-valor	n
MMP-2	MMP-9	-0.59	p=0.0006	15
	MMP-14	0.76	p<0.0001	15
	TIMP-1	0.53	p=0.0024	15
	TIMP-2	0.56	p=0.0014	15
	TIMP-3	0.61	p=0.0004	15
	RECK	0.80	p<0.0001	15
MMP-9	MMP-14	-0.69	p<0.0001	15
	TIMP-1	-0.83	p<0.0001	15
	TIMP-2	-0.52	p=0.0031	15
	TIMP-3	-0.86	p<0.0001	15
	RECK	-0.75	p<0.0001	15
MMP-14	TIMP-1	0.78	p<0.0001	15
	TIMP-2	0.50	p=0.0047	15
	TIMP-3	0.76	p<0.0001	15
	RECK	0.83	p<0.0001	15
TIMP-1	TIMP-2	0.60	p=0.0004	15
	TIMP-3	0.96	p<0.0001	15
	RECK	0.85	p=<0.0001	15
TIMP-2	TIMP-3	0.64	p=0.0002	15
	RECK	0.78	p<0.0001	15
TIMP-3	RECK	0.87	p<0.0001	15

4.1.3. Expressão gênica das isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e de seus receptores (T β RI e T β RII) em linhagens de carcinoma mamário humano, com diferentes capacidade invasivas

A fim de investigar o papel de TGF- β como um possível candidato responsável pelo controle coordenado da expressão das MMPs, TIMPs e RECK, foram analisados os níveis de expressão gênica das isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e receptores específicos de TGF- β (T β RI e T β RII), em células de câncer de mama com capacidades invasivas e metastáticas distintas (Figura 13).

Os resultados obtidos demonstraram que o gene TGF- β 2 é mais expresso nas linhagens de carcinoma mamário MDA-MB-231 ($p < 0.01$) e Hs578T ($p < 0.001$), em relação às células MCF-7 (Figura 13A). Da mesma forma, os níveis de expressão gênica dos receptores de TGF- β , T β RI e T β RII, mostraram-se significativamente elevados na linhagem Hs578T ($p < 0.001$ e $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 13B). Em contraste, os níveis de mRNA de TGF- β 3 apresentaram-se significativamente reduzidos na linhagem altamente invasiva MDA-MB-231 ($p < 0.01$), quando comparados aos níveis de expressão desse gene em uma linhagem pouco invasiva, MCF-7 (Figura 13A). A expressão de mRNA de TGF- β 1 foi menor nas células ZR-75-1 ($p < 0.05$) do que na linhagem MCF-7 (Figura 13A).

Figura 13: Análise dos níveis de expressão de mRNA das isoformas de TGF- β e de seus receptores, em linhagens de carcinoma mamário humano com diferentes potenciais de agressividade.

Ensaio de qRT-PCR foram realizados para análise dos níveis de mRNA das (A) isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e (B) receptores de TGF- β (T β RI e T β RII) em um painel de cinco linhagens de carcinoma mamário humano, com distintas capacidades invasivas e metastáticas. As amostras de RNA total foram extraídas quando estas células atingiram confluência celular de 80-90%. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Dunn's. Tem-se que: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, todos versus o controle (MCF-7).

4.1.4. Correlação entre os níveis de expressão gênica das isoformas e receptores de TGF- β versus a expressão de mRNA de MMPs e seus inibidores, em linhagens de carcinoma de mama humano com níveis de malignidade distintos

De posse dos resultados de expressão gênica obtidos para cada um dos genes da via de TGF- β analisados (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, T β RI e T β RII) (Figura 13), e dos dados de expressão relativa das MMPs (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) (Figura 11) e dos seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK) (Figura 12), foi possível avaliar a existência de correlação entre os níveis de expressão destes genes, em linhagens tumorais de mama, com motilidades diferentes (Tabelas 4 e 5). Para isso, os dados de expressão relativa de mRNA correspondentes a cada um dos genes avaliados, nas linhagens de carcinoma mamário humano selecionadas, foram submetidos à análise estatística de Correlação de Spearman (Tabelas 4 e 5).

Estas análises apontam uma correlação positiva entre os níveis de expressão de TGF- β 1 e TGF- β -2 em relação aos níveis transcricionais de MMPs (MMP-2 e MMP-14) e de seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK) (Tabela 4).

Os níveis de expressão relativa de TGF- β 1 correlacionam-se positivamente, e maneira significativa, com aqueles de MMP-2 ($p=0.0192$), MMP-14 ($p=0.0085$), TIMP-1 ($p<0.0001$), TIMP-3 ($p<0.0001$) e RECK ($p=0.0012$). Além disso, a isoforma 1 de TGF- β se correlacionou, de maneira positiva e significativa, com a expressão de T β RII ($p=0.0026$). De modo oposto, foi verificada uma correlação negativa entre os níveis de mRNA de TGF- β 1 e aqueles de expressão gênica da MMP-9 ($p<0.0005$) (Tabela 4).

Tabela 4: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica das isoformas de TGF- β e a expressão de mRNA de MMPs, inibidores de MMPs e receptores de TGF- β , em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

Os valores de p foram obtidos após submissão dos dados de expressão relativa de mRNA, obtidos através de ensaios de RT-PCR quantitativo, ao teste de correlação de Spearman. Foram utilizados os dados correspondentes aos três experimentos independentes de qRT-PCR, realizados em triplicata. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$), (n) o número de amostras analisadas e (r) o coeficiente de Spearman.

Teste de correlação de Spearman		r	p-valor	n
TGF- β 1	MMP-2	0.43	p=0.0192	15
	MMP-9	-0.60	p=0.0005	15
	MMP-14	0.47	p=0.0085	15
	TIMP-1	0.75	p<0.0001	15
	TIMP-2	0.30	p=0.103	15
	TIMP-3	0.79	p<0.0001	15
	RECK	0.56	p=0.0012	15
	TGF- β 2	0.33	p=0.0764	15
	TGF- β 3	-0.22	p=0.2326	15
	T β RI	-0.14	p=0.4691	15
	T β RII	0.53	p=0.0026	15
TGF- β 2	MMP-2	0.63	p=0.0002	15
	MMP-9	-0.50	p=0.0045	15
	MMP-14	0.85	p<0.0001	15
	TIMP-1	0.74	p<0.0001	15
	TIMP-2	0.66	p<0.0001	15
	TIMP-3	0.70	p<0.0001	15
	RECK	0.86	p<0.0001	15
	TGF- β 3	-0.61	p=0.0004	15
	T β RI	0.55	p=0.0017	15
	T β RII	0.78	p<0.0001	15
TGF- β 3	MMP-2	-0.23	p=0.2242	15
	MMP-9	0.62	p=0.0002	15
	MMP-14	-0.74	p<0.0001	15
	TIMP-1	-0.65	p<0.0001	15
	TIMP-2	-0.27	p=0.1552	15
	TIMP-3	-0.61	p=0.0004	15
	RECK	-0.51	p=0.0043	15
	T β RI	0.08	p=0.6831	15
	T β RII	-0.79	p<0.0001	15

A expressão transcricional de TGF- β 2 se correlacionou positivamente, e de forma estatisticamente significativa, com a expressão gênica de MMP-2 ($p=0.0002$), MMP-14 ($p=0.0045$), TIMP-1 ($p<0.0001$), TIMP-2 ($p<0.0001$), TIMP-3 ($p<0.0001$), RECK ($p<0.0001$), T β RI ($p=0.0017$) e T β RII ($p<0.0001$), em células de câncer de mama com potenciais invasivos distintos. Por sua vez, os níveis de expressão de mRNA de TGF- β 2 apresentaram-se correlacionados negativamente em relação aos valores de expressão gênica da MMP-9 ($p=0.0045$) e TGF- β 3 ($p=0.0004$) (Tabela 4).

De modo contrário ao previamente observado para as isoformas 1 e 2 de TGF- β , os níveis de expressão gênica de TGF- β 3 correlacionaram-se negativamente com os níveis de mRNA de MMP-14 ($p<0.0001$), TIMP-1 ($p<0.0001$), TIMP-3 ($p=0.0004$), RECK ($p=0.0043$) e T β RII ($p<0.0001$); e positivamente com a expressão de MMP-9 ($p=0.0002$) (Tabela 4).

Os níveis de mRNA de T β RI mostraram-se positivamente correlacionados às expressões gênicas de MMP-2 ($p=0.0268$), TIMP-2 ($p=0.0051$) e RECK ($p=0.0177$) (Tabela 5). Por sua vez, a expressão do receptor tipo II de TGF- β (T β RII) correlacionou-se, de modo positivo, com os níveis de MMP-2 ($p=0.0432$), MMP-14 ($p<0.0001$), TIMP-1 ($p<0.0001$), TIMP-2 ($p=0.0172$), TIMP-3 ($p<0.0001$) e RECK ($p<0.0001$). Contudo, o perfil de expressão de MMP-9, correlacionou-se negativamente com os níveis de mRNA deste receptor de TGF- β ($p<0.0001$) (Tabela 5).

Tabela 5: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica dos receptores de TGF- β e a expressão de mRNA de MMPs e seus inibidores, em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

Os valores de p foram obtidos após submissão dos dados de expressão relativa de mRNA, obtidos através de ensaios de RT-PCR quantitativo, ao teste de correlação de Spearman. Foram utilizados os dados correspondentes aos três experimentos independentes de qRT-PCR, realizados em triplicata. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$), (n) o número de amostras analisadas e (r) o coeficiente de Spearman.

Teste de correlação de Spearman		r	p-valor	N
T β RI	MMP-2	0.40	p=0.0268	15
	MMP-9	0.14	p=0.4749	15
	MMP-14	0.26	p=0.1693	15
	TIMP-1	0.14	p=0.4662	15
	TIMP-2	0.50	p=0.0051	15
	TIMP-3	0.13	p=0.5047	15
	RECK	0.43	p=0.0177	15
	T β RII	0.18	p=0.336	15
T β RII	MMP-2	0.37	p=0.0432	15
	MMP-9	-0.66	p<0.0001	15
	MMP-14	0.80	p<0.0001	15
	TIMP-1	0.86	p<0.0001	15
	TIMP-2	0.43	p=0.0172	15
	TIMP-3	0.81	p<0.0001	15
	RECK	0.70	p<0.0001	15

Dessa forma, foi possível demonstrar que, assim como a expressão de MMPs e de seus inibidores, de maneira geral, a expressão das isoformas e receptores de TGF- β , correlacionam-se positivamente com a agressividade das linhagens de carcinoma mamário analisadas (Tabelas 4 e 5).

4.1.5. Regulação da expressão gênica e protéica de MMPs e de seus inibidores (TIMPs e RECK) pelo tratamento com TGF- β 1 recombinante

Sabe-se que células tumorais respondem de maneiras distintas ao tratamento com TGF- β 1, ao longo da progressão tumoral. Em geral, linhagens celulares derivadas de tumores em estadios iniciais da tumorigênese, têm seu potencial proliferativo inibido, quando tratadas com TGF- β 1 recombinante. Por sua vez, esta citocina atua como indutor de invasão, transição epitélio-mesênquima e metástase, em tumores avançados (Jakowlew, 2006; Meulmeester and Ten Dijke, 2011). Para estudar o papel de TGF- β 1 como um modulador comum da expressão de moléculas classicamente associadas a regulação do potencial invasivo e metastático, utilizou-se a linhagem altamente invasiva de carcinoma mamário humano MDA-MB-231, como modelo de estudo. Dessa maneira, células desta linhagem foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante (0, 1, 5 e 10 ng/mL), por 20h.

Os valores de expressão de mRNA apresentados nas Figuras 14, 15 e 16, representam os valores médios obtidos, em triplicata, correspondentes a três experimentos independentes de tratamento com TGF- β 1 recombinante. Os dados de expressão gênica relativa foram calculados utilizando-se a linhagem MDA-MB-231 não tratada, como referência. O Fator de Normalização GeNorm foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR.

Cabe salientar que o aumento da expressão de PAI-1 foi utilizado como controle positivo do tratamento com TGF- β 1 recombinante, pois sua expressão é sabidamente regulada, ao nível transcricional, pela atividade desta citocina (Figura 14). Dessa forma, foi verificado que os níveis de expressão de mRNA de PAI-1 foram

significativamente ($p < 0.001$) aumentados, em aproximadamente 10 vezes, nas células submetidas ao tratamento com TGF- β 1, em relação à condição controle não tratado (Figura 14). Estes resultados foram repetidos para todas as concentrações de TGF- β 1 testadas.

Figura 14: Análise dos níveis de expressão gênica de PAI-1 na linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-231, tratada com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante.

Os níveis de expressão de mRNA de PAI-1 foram avaliados, como controle positivo do tratamento com TGF- β 1, através de ensaios de qRT-PCR. Utilizou-se amostras de RNA total, extraídas da linhagem MDA-MB-231, após 20h de tratamento com 0, 1, 5 ou 10ng/mL de TGF- β 1 recombinante. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Tem-se que: *** $p < 0.001$, todos versus o controle não tratado.

Confirmado que a linhagem MDA-MB-231 apresentava-se responsiva ao tratamento com o TGF- β 1 recombinante utilizado (Figura 14), foi avaliado se os níveis de expressão gênica e protéica de MMPs (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) (Figura

15) e seus de inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 E RECK) (Figura 16) são regulados por TGF- β 1.

A expressão de mRNA de MMP-2 foi significativamente aumentada na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com 1ng/mL ($p<0.05$) e 10ng/mL ($p<0.05$) de TGF- β 1, em relação às células não tratadas (Figura 15). De modo semelhante, os níveis de expressão gênica de MMP-9 foram induzidos pelo tratamento TGF- β 1, mostrando-se estatisticamente significativos para as concentrações de 1ng/mL ($p<0.05$) e 5ng/mL ($p<0.01$) (Figura 15). Por sua vez, os níveis transcricionais de MMP-14 foram elevados na linhagem MDA-MB-231 tratadas com 1ng/mL ($p<0.05$) e 10ng/mL ($p<0.05$) de TGF- β 1 (Figura 15).

Os resultados obtidos também demonstram que TGF- β 1 induz os níveis de expressão protéica de MMP-2 e MMP-9 (Figura 15). Para tanto, ensaios de Zimografia foram realizados, utilizando-se o meio condicionado de células MDA-MB-231 tratadas, por 48h, com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante (0, 1, 5 e 10ng/mL). Dessa forma, foi verificado que os níveis de expressão da proteína MMP-2, em sua forma ativa, são aumentados significativamente pelo tratamento com 10ng/mL ($p<0.01$) de TGF- β 1 recombinante (Figura 15). Similarmente, a expressão da pró-enzima MMP-9 foi elevada, de maneira estatisticamente significativa ($p<0.05$), pela submissão da linhagem MDA-MB-231 à maior concentração testada de TGF- β 1 (Figura 14).

Figura 15: Análise dos níveis de expressão relativa de mRNA e proteína de MMPs, na linhagem MDA-MB-231 tratada com diferentes concentrações de TGF-β1 recombinante.

Os níveis de expressão gênica de MMPs (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) foram avaliados em ensaios de qRT-PCR, utilizando-se o RNA total extraído da linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-231, tratada com 0, 1, 5 e 10 ng/mL de TGF-β1 recombinante, por 20h. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os níveis de expressão das proteínas MMP-2 e MMP-9, em suas respectivas formas ativas e de pró-enzima, foram analisadas em ensaios de Zimografia. O número de células em cada uma das condições experimentais foi utilizado como controle interno destes ensaios. Os extratos protéicos totais da linhagem MDA-MB-231, nas correspondentes condições de tratamento, foram utilizados para a quantificação dos níveis de expressão de proteína de MMP-14, através de ensaios de *Western-blotting*. A expressão de β-Tubulina foi usada como controle interno destes ensaios. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em pelo menos três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* e Zimografia mostram os resultados obtidos em um experimento representativo. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *, $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$, todos versus o controle não tratado.

De modo semelhante ao observado para expressão gênica de MMPs, foi verificado que os níveis de expressão de mRNA dos seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2 e RECK) são induzidos pelo tratamento da linhagem MDA-MB-231 com TGF- β 1 (Figura 16). Os níveis transcricionais de TIMP-1 foram significativamente maiores, apenas em células tratadas com 1ng/mL ($p < 0.05$) de TGF- β 1, em comparação às células não tratadas (Figura 16). Por sua vez, a expressão gênica de TIMP-2 foi induzida, de forma estatisticamente significativa, na linhagem MDA-MB-231 submetida ao tratamento com 1ng/mL ($p < 0.05$) e 5ng/mL ($p < 0.05$) desta citocina (Figura 16). Os resultados obtidos também demonstram que o inibidor de MMPs associado à membrana, RECK, tem seus níveis de expressão de mRNA significativamente elevados pelo tratamento com 5ng/mL ($p < 0.05$) e 10ng/mL ($p < 0.001$) de TGF- β 1 (Figura 16).

Através de ensaios de *Western-Blotting* foi verificado que, além da regulação ao nível transcricional, TGF- β 1 também é capaz de modular a expressão das proteínas TIMP-2 e RECK (Figura 16). Os níveis protéicos de TIMP-2 foram significativamente induzidos pelo tratamento com 10ng/mL ($p < 0.05$) TGF- β 1 (Figura 15). Por sua vez, a proteína RECK, ao contrário do previamente observado para sua expressão ao nível de mRNA, tem seus níveis reduzidos pelo tratamento com 5ng/mL ($p < 0.05$) de TGF- β 1 recombinante (Figura 16).

Figura 16: Análise dos níveis de expressão relativa de mRNA e proteína de inibidores de MMPs, na linhagem MDA-MB-231 tratada com diferentes concentrações de TGF-β1 recombinante.

Os níveis de expressão gênica de inibidores de MMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK) foram avaliados em ensaios de qRT-PCR, utilizando-se o RNA total extraído da linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-231, tratada com 0, 1, 5 e 10 ng/mL de TGF-β1 recombinante, por 20h. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os extratos protéicos totais da linhagem MDA-MB-231, nas condições de tratamento correspondentes, foram utilizados para a quantificação dos níveis de expressão protéica de RECK, através de ensaios de *Western-blotting*. A expressão de β-Tubulina foi usada como controle interno destes ensaios. O meio condicionado relativo a cada uma das condições experimentais foi usado para análise dos níveis de expressão protéica dos TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3) em ensaios de *Western-blotting*. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em pelo menos três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *, $p < 0.05$ e ***, $p < 0.001$, todos versus o controle não tratado.

Em conjunto, estes resultados demonstram que TGF- β 1 é capaz de modular, a expressão de MMPs (MMP-2 e MMP-9) e dos inibidores TIMP-2 e RECK, tanto ao nível transcricional, quanto ao de proteína, em células de carcinoma de mama altamente invasivas (Figuras 15 e 16).

4.1.6. Efeito de TGF- β 1 sobre a fosforilação das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK

Foi avaliada a função das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK, no mecanismo de regulação coordenada da expressão de MMPs, TIMPs e RECK por TGF- β 1, dada a implicação destas vias de sinalização em processos de indução de invasão e metástase, mediados por TGF- β 1 (Nagaraj and Datta, 2010). Neste sentido, primeiramente, foi verificado se esta citocina é capaz de modular os níveis de expressão das formas ativas/fosforiladas destas proteínas (Figuras 17 e 18).

Para tanto, extratos protéicos totais de células MDA-MB-231 tratadas com 10ng/mL de TGF- β 1 recombinante, por diferentes períodos de tempo (0, 5min, 10min, 20min, 30min, 45min, 1h, 2h e 3h), foram utilizados em ensaios de *Western-blotting*. Anticorpos específicos para as formas fosforilada e total das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK foram usados, conforme item 3.14 dos Materiais e Métodos. Calculou-se as razões entre as formas fosforilada (fosfo-ERK $\frac{1}{2}$ e fosfo-p38MAPK) e total (ERK $\frac{1}{2}$ total e p38MAPK total) destas proteínas, ao longo da cinética de tratamento da linhagem MDA-MB-231 com TGF- β 1. Os resultados são apresentados utilizando-se a linhagem MDA-MB-231, não tratada, como referência (Figuras 17 e 18).

Figura 17: Cinética de fosforilação de ERK^{1/2} na linhagem MDA-MB-231, tratada com TGF-β1 recombinante por diferentes períodos de tempo.

As células MDA-MB-231 foram tratadas com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante, por diferentes períodos de tempo (0, 5min, 10min, 20min, 30min, 45min, 1h, 2h e 3h). Extratos protéicos totais obtidos a partir destas condições experimentais foram utilizados para análise dos níveis de expressão das formas totais e fosforiladas de ERK^{1/2} através de *Western-blotting*. Estes resultados foram analisados e usados para o cálculo das razões fosfo-ERK^{1/2}/ERK^{1/2} total ao longo da cinética de tratamento com TGF-β1. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *, p<0.05, todos versus o controle não tratado.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível demonstrar que TGF-β1 é capaz de induzir a fosforilação tanto de ERK^{1/2} (Figura 17), quanto de p38MAPK (Figura 18), na linhagem MDA-MB-231. Dois picos de ativação foram observados para ambas MAPKs. A máxima fosforilação dessas proteínas foi atingida (p<0.05) após um curto período de tratamento com TGF-β1 (10min e 30min, para fosfo-ERK^{1/2}

e fosfo-p38MAPK, respectivamente). Por sua vez, um segundo pico de fosforilação foi observado mais tardiamente (1h e 3h, para fosfo-p38MAPK ($p < 0.05$) e fosfo-ERK $\frac{1}{2}$, respectivamente) (Figuras 17 e 18).

Figura 18: Cinética de fosforilação de p38MAPK na linhagem MDA-MB-231, tratada com TGF-β1 recombinante por diferentes períodos de tempo.

Células MDA-MB-231 foram tratadas com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante, por diferentes períodos de tempo (0, 5min, 10min, 20min, 30min, 45min, 1h, 2h e 3h). Extratos protéicos totais obtidos a partir destas condições experimentais foram utilizados para análise dos níveis de expressão das formas totais e fosforiladas de p38 MAPK através de *Western-blotting*. Estes resultados foram analisados e usados para o cálculo das razões fosfo-p38 MAPK/p38 MAPK total ao longo da cinética de tratamento com TGF-β1. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se análise de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *, $p < 0.05$, todos versus o controle não tratado.

Desta maneira, estes resultados mostram que TGF- β 1 é capaz de induzir a fosforilação/ativação das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK, na linhagem de câncer de mama altamente invasiva, MDA-MB-231 (Figuras 17 e 18).

4.1.7. Papel de ERK1/2 no mecanismo de regulação da expressão de MMPs e de seus inibidores por TGF- β 1

A função da via de sinalização mediada pelas proteínas ERK $\frac{1}{2}$, no mecanismo de regulação da expressão de MMPs e de seus inibidores (TIMPs e RECK) por TGF- β 1, também foi avaliada. Neste sentido, diferentes concentrações (0, 5, 10 e 20 μ M) de um inibidor farmacológico de ERK $\frac{1}{2}$ (PD98059) foram utilizadas para o pré-tratamento da linhagem MDA-MB-231, por 1h. Posteriormente, estas células foram estimuladas por 20h, com 10ng/mL de TGF- β 1 recombinante.

Os dados de expressão relativa foram calculados utilizando-se a linhagem MDA-MB-231 tratada com DMSO (veículo), como referência. O Fator de Normalização GeNorm foi utilizado como controle endógeno das reações de RT-PCR quantitativo. Dessa forma, foi verificado que o tratamento com PD98059 não afetou significativamente o aumento da expressão gênica de MMP-2, MMP-9 (Figura 19), TIMP-2 e RECK (Figura 20), induzidas por TGF- β 1. Os resultados apresentados (Figuras 19 e 20) representam os valores médios obtidos em triplicata, correspondentes a três experimentos independentes de tratamento com PD98059 e TGF- β 1 recombinante.

Figura 19: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína das MMPs moduladas por TGF-β1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de ERK1/2.

Células MDA-MB-231 pré-tratadas com diferentes concentrações (0, 5 10 e 20μM) de PD98059 (inibidor farmacológico de ERK1/2) foram estimuladas com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante, por 20h. As amostras de RNA total extraídas das células submetidas à estas condições de tratamento, foram usadas para a análise dos níveis de expressão de mRNA de MMP-2 e MMP-9, em ensaios de qRT-PCR. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os níveis de expressão das proteínas MMP-2 e MMP-9, em suas respectivas formas ativas e de pró-enzima, foram analisadas em ensaios de Zimografia. O número de células em cada uma das condições experimentais foi utilizado como controle interno destes ensaios. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos

independentes. As imagens de Zimografia são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Para as alterações dos níveis de expressão gênica, tem-se: MMP-2 (a versus c: $p<0.05$, a versus d: $p<0.01$, a versus e, f: $p<0.001$) e MMP-9 (a versus c, d, f: $p<0.01$). Para as alterações nos níveis de expressão protéica, tem-se: MMP-2 (a versus c: $p<0.01$, a versus d, e: $p<0.05$), MMP-9 (a versus c: $p<0.001$, c versus f: $p<0.001$).

Por sua vez, para avaliação dos níveis protéicos de MMP-9 e TIMP-2, ensaios de Zimografia e de *Western-Blotting*, respectivamente foram realizados, utilizando-se o meio condicionado das células MDA-MB-231, submetidas às diferentes condições de tratamento. Assim, observou-se que pré-tratamento das células com 20 μ M de PD98059 reverteu, de forma significativa ($p<0.001$), o aumento dos níveis protéicos de MMP-9 (Figura 19) e TIMP-2 (Figura 20), provocado pelo tratamento com TGF- β 1.

Além disso, o inibidor farmacológico de ERK1/2 não apenas bloqueou o efeito de inibição da expressão da proteína RECK, mediado pelo tratamento com TGF- β 1, mas, também, induziu significativamente sua expressão, analisada mediante ensaios de *Western-blotting* (Figura 20). Células MDA-MB-231 tratadas com 20 μ M de PD98059 e com 10ng/mL de TGF- β 1 apresentaram maior expressão protéica relativa de RECK, em comparação às células tratadas apenas com o veículo ($p<0.05$) ou com TGF- β 1 ($p<0.001$) (Figura 20).

Figura 20: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína dos inibidores de MMPs modulados por TGF-β1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de ERK½.

Células MDA-MB-231 pré-tratadas com diferentes concentrações (0, 5 10 e 20μM) de PD98059 (inibidor farmacológico de ERK½) foram estimuladas com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante, por 20h. Para os ensaios de qRT-PCR foram utilizadas amostras de RNA total extraídas das células submetidas às diferentes condições de tratamento. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Extratos protéicos totais de células submetidas às diferentes condições de tratamento foram utilizados para a quantificação dos níveis de expressão protéica de RECK, através de ensaios de *Western-blotting*. A expressão de GAPDH foi usada como controle interno destes ensaios. O meio condicionado das culturas submetidas a cada uma das condições experimentais foi usado para análise dos níveis de expressão protéica de TIMP-2 em

ensaios de *Western-blotting*. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Para as alterações dos níveis de expressão gênica, tem-se: TIMP-2 (a versus b: $p < 0.01$, a versus c: $p < 0.05$, a versus d, e, f: $p < 0.001$) e RECK (a versus b, c: $p < 0.05$, a versus d, e, f: $p < 0.001$). Para as alterações nos níveis de expressão protéica, tem-se: TIMP-2 (a versus c: $p < 0.01$, c versus f: $p < 0.001$) e RECK (a versus c: $p < 0.01$, a versus f: $p < 0.05$, c versus e, f: $p < 0.001$).

Em conjunto, estes dados sugerem que a atividade de ERK $\frac{1}{2}$ media a regulação da expressão das proteínas MMP-9, TIMP-2 e RECK, induzido por TGF- β 1, em células de câncer de mama altamente invasivas.

4.1.8. Função de p38MAPK no mecanismo de regulação da expressão de MMPs e de seus inibidores por TGF- β 1

Neste trabalho, foi investigado, também, o papel de p38MAPK no mecanismo proposto de regulação coordenada da expressão de MMPs e de seus inibidores, por TGF- β 1. Para tanto, células MD-MB-231 pré-tratadas, por 1h, com diferentes concentrações (0, 5, 10 e 20 μ M) de SB203680 (inibidor farmacológico de p38MAPK), foram estimuladas com TGF- β 1 recombinante (10ng/mL).

As possíveis alterações nos níveis de expressão gênica de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e RECK, provocadas pela inibição de p38MAPK, foram avaliadas em ensaios de qRT-PCR. Nas Figuras 21 e 22 são apresentados os valores médios obtidos em triplicata, correspondentes a três experimentos independentes de tratamento com SB203680 e/ou TGF- β 1 recombinante. As células tratadas com o veículo (DMSO) foram utilizadas como referência para o cálculo dos dados de expressão relativa. O

Fator de Normalização GeNorm, utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR.

O tratamento da linhagem MDA-MB-231 com este inibidor de p38MAPK bloqueou, significativamente ($p<0.05$), a indução da expressão de mRNA de todos os membros da família das MMPs (MMP-2 e MMP-9) (Figura 21) e dos inibidores de MMPs (TIMP-2 e RECK) (Figura 22) avaliados. Os níveis de mRNA de MMP-2 ($p<0.05$) e MMP-9 ($p<0.01$) foram significativamente reduzidos nas células tratadas com 10ng/mL de TGF- β 1 e com a maior concentração de SB203680 (20 μ M), em relação à linhagem celular apenas exposta ao tratamento com TGF- β 1 (Figura 21).

Através de ensaios de Zimografia, foi observado que o tratamento das células MDA-MB-231, com a maior concentração testada (20 μ M) de SB203680, inibiu significativamente ($p<0.05$), os níveis da forma ativa da proteína MMP-2 induzidos por TGF- β 1 (Figura 21). Por sua vez, a inativação de p38MAPK não provocou efeito significativo algum sobre os níveis protéicos de pró-MMP-9 (Figura 21).

Figura 21: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína das MMPs moduladas por TGF- β 1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de p38MAPK.

Células MDA-MB-231 pré-tratadas com diferentes concentrações (0, 5 10 e 20 μ M) de SB203680 (inibidor farmacológico de p38MAPK) foram estimuladas com 10ng/mL de TGF- β 1 recombinante, por 20h. Amostras de RNA total extraídas das células submetidas às estas condições de tratamento, foram usadas para a análise dos níveis de expressão de mRNA de MMP-2 e MMP-9, em ensaios de qRT-PCR. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os níveis de expressão das proteínas MMP-2 e MMP-9, em suas respectivas formas ativas e de pró-enzima, foram analisadas em ensaios de Zimografia. O número de células em cada uma das condições experimentais foi utilizado como controle interno destes ensaios. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos

independentes. As imagens de Zimografia são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Para as alterações dos níveis de expressão gênica, tem-se: MMP-2 (a versus c: $p < 0.05$, c versus f: $p < 0.05$) e MMP-9 (a versus c: $p < 0.001$, a versus d: $p < 0.05$, c versus f: $p < 0.01$). Para as alterações nos níveis de expressão protéica, tem-se: MMP-2 (a versus c: $p < 0.01$, c versus f: $p < 0.05$) e MMP-9 (a versus c: $p < 0.001$, a versus d: $p < 0.05$).

A inibição de p38MAPK, por meio do tratamento da linhagem MDA-MB-231 com 10 ($p < 0.05$) ou 20 μM ($p < 0.001$) de SB203680, levou à reversão significativa da indução da expressão gênica de TIMP-2 e RECK, gerada pelo tratamento com TGF- β 1 (Figura 22). Portanto, foi verificado que menores concentrações (10 μM) deste inibidor de MAPK foram suficientes para abolir, de maneira significativa, o efeito de TGF- β 1 sobre os níveis de expressão de mRNA de inibidores de MMPs, em comparação àsquelas necessárias (20 μM) para bloqueio da indução de MMP-2 e MMP-9.

A modulação da expressão dos inibidores de MMPs (TIMP-2 e RECK) foi avaliada em ensaios de *Western-blotting*, utilizando-se, respectivamente, os meios condicionados e os extratos protéicos totais, da linhagem MDA-MB-231, submetida ao tratamento com SB203680 e TGF- β 1. Dessa forma, demonstrou-se que 20 μM deste inibidor farmacológico de p38MAPK foi capaz de bloquear a elevação dos níveis da proteína TIMP-2, induzida pelo tratamento com TGF- β 1 (Figura 22). Entretanto, nenhuma das concentrações testadas de SB203680 reverteu o efeito inibitório de TGF- β 1 sobre a expressão da proteína RECK (Figura 22).

Figura 22: Análise dos níveis de expressão de mRNA e proteína dos inibidores de MMPs modulados por TGF-β1, na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de p38MAPK.

Células MDA-MB-231 pré-tratadas com diferentes concentrações (0, 5 10 e 20μM) de SB203680 (inibidor farmacológico de p38MAPK) foram estimuladas com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante, por 20h. As amostras de RNA total extraídas das células submetidas às diferentes condições de tratamento, foram usadas para a análise dos níveis de expressão de mRNA de TIMP-2 e RECK, em ensaios de qRT-PCR. O Fator de Normalização, calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT e HMBS, foi utilizado como controle endógeno das reações de qRT-PCR. Os extratos protéicos totais da linhagem MDA-MB-231, nas condições de tratamento correspondentes, foram utilizados para a quantificação dos níveis de expressão protéica de RECK, através de ensaios de *Western-blotting*. A expressão de GAPDH foi usada como controle interno destes ensaios. O meio condicionado correspondente a cada uma das condições

experimentais foi usado para análise dos níveis de expressão protéica de TIMP-2 em ensaios de *Western-blotting*. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Para as alterações dos níveis de expressão gênica, tem-se: TIMP-2 (c versus e: $p < 0.05$, c versus f: $p < 0.001$) e RECK (a versus c: $p < 0.01$, c versus e: $p < 0.05$, c versus f: $p < 0.001$). Para as alterações nos níveis de expressão protéica, tem-se: TIMP-2 (a versus c: $p < 0.05$, c versus f: $p < 0.05$) e RECK (a versus c, e, f: $p < 0.001$, a versus d: $p < 0.05$).

Estes resultados indicam que p38MAPK é essencial para a mediação do efeito de TGF- β 1 sobre a expressão de mRNA de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e RECK, e sobre os níveis protéicos de MMP-2 e TIMP-2. Além disso, em oposição ao que foi previamente verificado para ERK $\frac{1}{2}$ (Figuras 19 e 20), a atividade de p38MAPK parece não estar envolvida o efeito de TGF- β 1, como indutor da expressão das proteínas MMP-9 e RECK.

4.1.9. Interação entre as vias de sinalização mediadas por ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK na linhagem MDA-MB-231

Os resultados previamente apresentados indicam que as proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK estão envolvidas no mecanismo de regulação da expressão de MMPs e de seus inibidores, por TGF- β 1. Foi investigado se estas vias de transdução de sinal são capazes de interagir entre si, em células MDA-MB-231, após sua exposição ao tratamento com TGF- β 1 recombinante. Com este intuito, por meio da administração de inibidores farmacológicos específicos, foi examinado se a inibição de ERK $\frac{1}{2}$ altera os níveis de expressão de fosfo-p38 MAPK, e se o tratamento da linhagem MDA-MB-231 com inibidor de p38 MAPK induz modificação nos níveis de fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$.

As células foram pré-tratadas por 1h, com 20 μ M do inibidor farmacológico de ERK $\frac{1}{2}$ ou de p38 MAPK (PD98059 e SB203680, respectivamente). Posteriormente, foi realizado o tratamento com 10ng/mL de TGF- β 1, por períodos de tempo correspondentes aos picos de máxima ativação de cada uma dessas MAPKs. Sabe-se que ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK apresentaram cinéticas de ativação distintas, após estímulo da linhagem MDA-MB-231 com TGF- β 1, conforme previamente demonstrado nas Figuras 17 e 18. Portanto, depois do pré-tratamento com PD98059, as células foram estimuladas com TGF- β 1 por 10min e 3h. Por sua vez, a linhagem MDA-MB-231 exposta ao inibidor de p38MAPK, foi tratada com TGF- β 1 por 30min e 1h.

Após estes tratamentos, ensaios de *Western-Blotting* foram realizados conforme item 3.14 dos Materiais e Métodos, utilizando-se anticorpos específicos para as formas fosforiladas e totais das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK. Os resultados obtidos são utilizados para o cálculo das razões entre as formas fosforiladas (fosfo-ERK $\frac{1}{2}$ e fosfo-p38MAPK) e totais (ERK $\frac{1}{2}$ total e p38MAPK total) destas proteínas.

Por ensaios de *Western-blot* foi mostrado que células tratadas com 20 μ M de PD98059 expressam níveis significativamente menores ($p < 0.001$) das proteínas fosfo-ERK $\frac{1}{2}$, em relação às células apenas tratadas TGF- β 1 (Figura 23). Este resultados foram obtidos para ambos períodos de tratamento com esta citocina, ou seja, 10min e 3h (Figura 23). Por sua vez, a exposição das células MDA-MB-231 a SB203680 levou à fosforilação significativamente atenuada de p38MAPK, em comparação com a linhagem celular estimulada com TGF- β 1, por 30min ($p < 0.05$) e 1h ($p < 0.01$) (Figura 25). Dessa forma, confirmou-se que estes inibidores

farmacológicos são capazes de bloquear a ativação/fosforilação dessas MAPKs induzida pela ação de TGF- β 1.

Figura 23: Análise da fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor específico para esta MAPK, e estimulada com TGF- β 1 recombinante por diferentes períodos de tempo.

As células MDA-MB-231 foram pré-tratadas por 1h, com 20 μ M de PD98059. Em seguida, estas células foram estimuladas com 10ng/mL de TGF- β 1 recombinante, por diferentes períodos de tempo (0, 10min e 3h). Os extratos protéicos totais obtidos a partir destas condições experimentais foram utilizados para análise dos níveis de expressão das formas totais e fosforiladas de ERK $\frac{1}{2}$ por ensaios de *Western-blotting*, como controle positivo do tratamento com PD98059. Estes dados foram analisados e usados para o cálculo das razões fosfo-ERK $\frac{1}{2}$ /ERK $\frac{1}{2}$ total. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. ***, $p < 0.001$, todos versus o controle tratado com DMSO (veículo).

Confirmada a ação inibitória de PD98059 sobre a ativação de ERK $\frac{1}{2}$, foi analisada a influência desta via de sinalização sobre a atividade de p38 MAPK. Neste sentido, foram examinados os níveis de expressão de fosfo-p38 MAPK na linhagem MDA-MB-231 submetida ao tratamento com o inibidor de ERK $\frac{1}{2}$ (Figura 24). A exposição destas células a PD98059, por 3h, levou ao aumento significativo ($p<0.001$) da proteína p38 MAPK, em sua forma fosforilada, em relação às células tratadas com DMSO (veículo), assim como em relação às tratadas com TGF- β 1 ($p<0.05$). A adição de TGF- β 1 às células tratadas com PD98059, não induziu mudança significativa nos níveis de fosfo-p38 MAPK (Figura 24).

Resultados similares foram observados para o controle da ativação de ERK $\frac{1}{2}$ pela ação de p38 MAPK. Através da realização de ensaios de *Western-Blotting*, investigou-se alterações nas razões entre as formas fosforiladas e totais das proteínas ERK $\frac{1}{2}$, em células MDA-MB-231 tratadas com SB203680 e TGF- β 1 (Figura 26). A expressão de fosfo-ERK $\frac{1}{2}$ foi significativamente maior ($p<0.001$) na linhagem tratada com inibidor de p38 MAPK, em comparação às células expostas a TGF- β 1 por 30min. Por sua vez, a adição desta citocina às células tratadas com SB203680, não levou a alterações nos níveis de ativação/fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ (Figura 26).

Figura 24: Análise da fosforilação de p38MAPK na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de ERK $\frac{1}{2}$ e estimulada com TGF-β1 recombinante, por diferentes períodos de tempo.

As células MDA-MB-231 foram pré-tratadas por 1h, com 20μM de PD98059 (inibidor farmacológico de ERK $\frac{1}{2}$). Em seguida, estas células foram estimuladas com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante, por diferentes períodos de tempo (0, 10min e 3h). Os extratos protéicos totais obtidos a partir destas condições experimentais foram utilizados para análise dos níveis de expressão da forma total e fosforilada de p38MAPK por ensaios de *Western-blotting*. Estes dados foram analisados e usados para o cálculo das razões fosfo-p38MAPK/p38MAPK total. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *, $p < 0.05$, todos versus o controle tratado com DMSO (veículo).

Figura 25: Análise da fosforilação de p38MAPK na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor específico para esta MAPK, e estimulada com TGF-β1 recombinante por diferentes períodos de tempo.

Células MDA-MB-231 foram pré-tratadas por 1h, com 20μM de SB203680 (inibidor farmacológico de p38MAPK). Em seguida, estas células foram estimuladas com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante, por diferentes períodos de tempo (0, 30min e 1h). Os extratos protéicos totais obtidos a partir destas condições experimentais foram utilizados para análise dos níveis de expressão da forma total e fosforilada de p38MAPK por ensaios de *Western-blotting*, como controle positivo do tratamento com SB203680. Estes dados foram analisados e usados para o cálculo das razões fosfo-p38MAPK/p38MAPK total. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *, $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$, todos versus o controle tratado com DMSO (veículo).

Figura 26: Análise da fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ na linhagem MDA-MB-231 tratada com inibidor de p38MAPK, e estimulada com TGF- β 1 recombinante por diferentes períodos de tempo.

As células MDA-MB-231 foram pré-tratadas por 1h, com 20 μ M de SB203680 (inibidor farmacológico de p38MAPK). Em seguida, estas células foram estimuladas com 10ng/mL de TGF- β 1 recombinante, por diferentes períodos de tempo (0, 30min e 1h). Os extratos protéicos totais obtidos a partir destas condições experimentais foram utilizados para análise dos níveis de expressão da forma total e fosforilada de ERK $\frac{1}{2}$ por ensaios de *Western-blotting*. Estes dados foram analisados e usados para o cálculo das razões fosfo-ERK $\frac{1}{2}$ /ERK $\frac{1}{2}$ total. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. ***, $p < 0.001$, todos versus o controle tratado com DMSO (veículo).

Em conjunto, estes resultados indicam que alterações na ativação das proteínas ERK $\frac{1}{2}$ levam a modulação da expressão de p38 MAPK fosforilada, na linhagem MDA-MB-231, tendo sido observado que a inibição de ERK $\frac{1}{2}$ induz a fosforilação de p38 MAPK neste modelo. De modo semelhante, a proteína p38MAPK tem influência sobre a atividade de ERK $\frac{1}{2}$, dado que o tratamento destas células com

SB203680 levou ao aumento da expressão de fosfo-ERK $\frac{1}{2}$. Entretanto, foi observado que TGF- β 1 não atua sobre o mecanismo de *crosstalk* entre as vias de ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK, pois a adição desta citocina às células pré-tratadas com seus inibidores específicos, não levaram a alterações nos níveis de fosforilação destas MAPKs.

4.1.10. Papel de ERK $\frac{1}{2}$, p38 MAPK e MMPs no efeito de TGF- β 1 sobre o potencial migratório e invasivo da linhagem MDA-MB-231

Os resultados anteriores suportam a hipótese de que TGF- β 1 é um modulador comum da expressão de MMPs e de seus inibidores, moléculas classicamente envolvidas no controle da motilidade e invasividade celulares. Para avaliar o possível efeito desta citocina sobre a capacidade migratória e invasiva da linhagem MDA-MB-231 foram realizados ensaios *in vitro*, utilizando-se insertos celulares do tipo Transwell™, conforme descrito nos itens 3.7 e 3.8 dos Materiais e Métodos. Células MDA-MB-231, previamente carenciadas para soro por 18h, foram plaqueadas sobre as membranas porosas destes insertos. Para os ensaios de invasão, foram usados Transwells™ revestidos com membrana basal reconstituível do tipo MATRIGEL®.

Decorridas 8 e 24h de exposição à TGF- β 1, as células presentes na parte inferior dos Transwells™ foram fixadas, coradas e contadas para análise, respectivamente, do potencial migratório e invasivo da linhagem MDA-MB-231. Os resultados obtidos mostram que células expostas à 10ng/mL de TGF- β 1, apresentaram aumento significativo ($p < 0.001$) tanto de seu potencial migratório (Figura 27), quanto invasivo (Figura 28), em relação às células tratadas com DMSO (veículo).

Figura 27: Migração celular *in vitro* da linhagem MDA-MB-231 tratada com TGF-β1 e/ou com inibidores ERK $\frac{1}{2}$, p38MAPK e MMPs.

Células MDA-MB-231 foram pré-tratadas por 1h com 20μM de PD98059 ou SB203680 (inibidores farmacológicos de ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK, respectivamente) ou com 40μM de GM6001 (inibidor de MMPs de amplo espectro). Posteriormente, estas células foram estimuladas com 10ng/mL de TGF-β1 e mantidas em *transwells* não revestidos por 8h. O número de células presentes na porção inferior desses insertos foi determinado após sua fixação e coloração. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em duplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *** $p < 0.001$.

Posteriormente, foi investigado se as proteínas ERK $\frac{1}{2}$, p38MAPK e MMPs, atuam como mediadores do efeito de TGF-β1 sobre a motilidade da linhagem MDA-MB-231. Com este objetivo, estas células foram pré-tratadas por 1h, com 20μM de PD98059 ou SB203680 (inibidores farmacológicos de ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK, respectivamente) ou com 40μM de GM6001 (inibidor de MMPs de largo espectro), previamente ao estímulo com 10ng/mL de TGF-β1.

Figura 28: Invasão celular in vitro da linhagem MDA-MB-231 tratada com TGF-β1 e com inibidores ERK $\frac{1}{2}$, p38MAPK e MMPs.

Células MDA-MB-231 foram pré-tratadas por 1h com 20μM de PD98059 ou SB203680 (inibidores farmacológicos de ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK, respectivamente) ou com 40μM de GM6001 (inibidor de MMPs de amplo espectro). Posteriormente, estas células foram estimuladas com 10ng/mL de TGF-β1 e mantidas em insertos, revestidos com membrana basal reconstituível (MATRIGEL®), por 24h. O número de células presentes na porção inferior desses insertos foram fixadas, coradas e contadas. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em duplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *** $p < 0.001$.

A inibição das atividades de ERK $\frac{1}{2}$, p38 MAPK e MMPs, não levaram a alterações estatisticamente significativas, das capacidades de migração (Figura 27) e invasão celulares (Figura 28) da linhagem MDA-MB-231, em relação às culturas controle tratadas com DMSO. Contudo, o tratamento com PD98059, SB203680 e GM6001 bloqueou significativamente ($p < 0.001$) a indução de migração (Figura 27) e invasão (Figura 28) induzidas pelo tratamento com 10ng/mL de TGF-β1 recombinante.

Em conjunto, estes resultados mostram que o aumento do potencial migratório e invasivo da linhagem MDA-MB-231, provocado pelo tratamento com TGF- β 1, é mediada tanto por um aumento da atividade de MMPs, como pela ativação de ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK.

4.2. RECK ao longo do desenvolvimento da glândula mamária

O papel da proteína RECK em processos relacionados à progressão tumoral tem sido muito explorado pela literatura. Entretanto, muito pouco foi descrito sobre a função desta proteína em processos fisiológicos normais. Muitas moléculas associadas aos repetidos ciclos de alterações morfológicas, aos quais a glândula mamária é submetida ao longo de seu desenvolvimento pós-natal, estão relacionadas à tumorigênese. Para o melhor entendimento da função de RECK no tecido mamário, no presente trabalho, foram iniciadas as análises sobre a expressão de RECK ao longo do desenvolvimento da glândula mamária.

4.2.1. Expressão de mRNA e proteína correspondentes ao inibidor de MMPs associado à membrana (RECK) em ensaios de diferenciação de mama murina

Primeiramente, foi analisado o perfil de expressão de mRNA e proteína de RECK em ensaios de diferenciação *in vitro* da glândula mamária. Para tanto, foram utilizadas três linhagens epiteliais distintas (EpH4, CID-9 e ScP-2), derivadas de tecidos mamários normais de camundongos fêmeas, classicamente utilizadas como modelo de diferenciação mamária *in vitro*.

Previamente aos ensaios de diferenciação propriamente ditos, foram analisados os níveis de expressão da proteína RECK nestas linhagens (Figura 29). Os extratos protéicos totais correspondentes a estas células foram extraídos e analisados em ensaios de *Western-Blotting*. Os dados apresentados na Figura 29 demonstram que todas estas linhagens expressam a proteína RECK. Além disso, constatou-se que as células CID-9 apresentam níveis significativamente ($p < 0.001$) mais elevados, quando comparados aos níveis protéicos detectados nas células EpH4 e ScP-2. Por sua vez, os níveis da proteína RECK na linhagem EpH4 são significativamente menores ($p < 0.001$), em relação às outras células analisadas (CID-9 e ScP-2) (Figura 29).

Figura 29: Análise da expressão da proteína RECK em linhagens celulares epiteliais de mama normal de camundongo.

Os extratos protéicos totais das linhagens murinas não tumorigênicas EPH4, CID-9 e ScP-2, foram utilizados para a quantificação dos níveis de expressão protéica de RECK através de ensaios de *Western-blotting*. A proteína β -Actina foi usada como controle interno destes ensaios. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em pelo menos três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *** $p < 0.001$.

Confirmada a expressão da proteína RECK nestas linhagens (EpH4, CID-9 e ScP-2), foram realizados os ensaios de diferenciação da glândula mamária *in vitro*. Dessa forma, células destas linhagens foram tratadas com meio de diferenciação contendo prolactina, hidrocortisona, insulina e elementos da matriz extracelular (MATRIGEL®), conforme previamente descrito no item 3.9 dos Materiais e Métodos. A indução da expressão gênica de β -caseína foi utilizada como controle positivo destes experimentos de diferenciação mamária (Figura 30). Através de ensaios de RT-PCR quantitativo, utilizando-se a expressão do RNA Ribossomal 18S como

controle endógeno, confirmou-se o aumento significativo ($p < 0.001$) dos níveis de mRNA de β -caseína, pelo estímulo hormonal, nas células Eph4 e CID-9 (Figura 30). Por sua vez, observou-se apenas uma tendência de indução de β -caseína em células ScP-2 tratadas com prolactina e hidrocortisona (Figura 30).

Figura 30: Análise da expressão gênica de β -caseína nas células Eph4, CID-9 e ScP-2, como controle positivo dos ensaios de diferenciação da glândula mamária, através de estímulo com hormônios.

Ensaio de RT-PCR quantitativo foram realizados para análise da expressão de mRNA de β -caseína nas células epiteliais de mama de camundongo tratadas com prolactina e hidrocortisona. Os níveis transcricionais do RNA ribossomal 18S foram usados como controle endógeno destas reações. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste t. *** $p < 0.001$.

Posteriormente, foram examinados os níveis de expressão ao nível de mRNA (Figura 31A) e proteína (Figura 31B) de RECK nas linhagens submetidas ao tratamento hormonal, através de ensaios de qRT-PCR e *Western-Blotting*, respectivamente. A expressão de mRNA de RECK foi significativamente reduzida ($p<0.001$) em células EpH4 e CID-9 tratadas com os hormônios prolactina e hidrocortisona, em comparação com aos níveis de expressão gênica detectados nas respectivas células controle não tratadas (Figura 31A).

Por sua vez, a inibição da expressão protéica de RECK, induzida pelo tratamento hormonal, foi estatisticamente significativa ($p<0.001$) apenas nas células CID-9 (Figura 31B). Em conjunto, estes resultados indicam que a expressão de RECK (mRNA e proteína) está inversamente relacionada à expressão de β -caseína e, conseqüentemente, à produção de leite e à máxima diferenciação da glândula mamária.

Figura 31: Expressão de mRNA e proteína de RECK em ensaios de diferenciação da glândula mamária *in vitro*, nas células EPH4, CID-9 e ScP-2 estimuladas com hormônios.

(A) Ensaios de RT-PCR quantitativo foram realizados para análise da expressão de mRNA de RECK nas células epiteliais de mama murina tratadas com prolactina. Os níveis transcricionais do RNA ribossomal 18S foram usados como controle endógeno destas reações. (B) Ensaios de *Western-blotting* foram realizados para determinação da expressão da proteína RECK. A expressão de β -Actina foi usada como controle interno destes dos ensaios. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* mostram os resultados obtidos em um experimento representativo. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste t. *** $p < 0.001$.

4.2.2. Avaliação da expressão e localização de RECK em amostras de mama em diferentes estágios do desenvolvimento

O perfil de expressão de RECK foi analisado, em amostras teciduais de mama de camundongos fêmeas CD-1, em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal (virgem, gestante, lactação e involução). Foram incluídas nesta análise: quatro

amostras de mama de camundongos fêmeas virgens, sete de gestantes, duas de lactantes e cinco amostras de mama no estágio de involução.

Ensaio de qRT-PCR e *Western-Blotting* foram realizados para avaliação dos níveis de expressão de mRNA e proteína, respectivamente, de RECK nestas amostras (Figura 32). Os dados de expressão gênica obtidos para o RNA Ribossomal 18S foram utilizados como controle endógeno dos ensaios de RT-PCR quantitativo. Os resultados obtidos indicam o mRNA de RECK é mais expresso em amostras de mama derivadas de camundongos fêmeas gestantes (Figura 32). De modo similar, os níveis da proteína RECK mostraram-se mais altos em amostras de mama de animais em gestação (Figura 32). A expressão protéica de Lamina A/C foi usada como normalizador nestes experimentos.

Figura 32: Análise da expressão de mRNA e proteína de RECK em amostras de mama murina em diferentes estágios do desenvolvimento (virgem, gestação, lactação e involução).

(A) Amostras de tecidos mamários foram coletadas de camundongas Balb/c virgens, grávidas, lactantes e pós-amamentação. Os níveis de expressão gênica de RECK nestas amostras foram avaliados em ensaios de RT-PCR quantitativo, utilizando-se a expressão de mRNA do RNA ribossomal 18S como controle endógeno destas reações. (B) Ensaios de *Western-blotting* para determinação da expressão da proteína RECK foram realizados. A expressão de Lamina A/C foi usada como controle interno destes dos ensaios. Ao menos Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores de expressão relativa obtidos. Foram analisadas: quatro amostras de mama derivadas de camundongas virgens, sete amostras de mama de camundongas gestantes, duas amostras de mama Lactantes e cinco amostras mamárias no estágio de involução.

Ensaios de imunofluorescência também foram realizados para análise da localização e expressão da proteína RECK em amostras mamárias murinas (Figura 33). Nestes ensaios, foram examinadas amostras teciduais de mama derivadas de camundongos fêmeas, do tipo Balb/c, virgens e lactantes. A expressão da proteína α -SMA (*Alpha-Smooth Muscle Actin*) foi utilizada como marcador de células mioepiteliais. Na Figura 33 são apresentadas micrografias obtidas em microscópios de fluorescência, após a marcação destes tecidos com DAPI (azul) e com anticorpos específicos para RECK (verde) e α -SMA (vermelho).

Nestas imagens, foi possível verificar que RECK é menos expresso em amostras de mama derivadas de camundongos virgens, em comparação as amostras de mama de animais lactantes (Figura 33). Além disso, a sobreposição das imagens geradas pela marcação das amostras de animais virgens, com os anticorpos anti-RECK e anti- α -SMA, apontam que RECK é expresso em células mioepiteliais e pelo estroma que circunda os ductos mamários (Figura 33A).

Por sua vez, nas amostras teciduais de mama, derivadas de animais lactantes, as células positivas para RECK são predominantemente do tipo epitelial. Na Figura 33B, foi detectada uma forte marcação para RECK nos lóbulos mamários produtores de leite, assim como a ausência de sua expressão nos ductos.

Em conjunto, estes resultados sugerem que RECK é diferencialmente expresso ao longo do desenvolvimento pós-natal da mama murina. Além disso, os tipos celulares que apresentam marcação positiva para esta proteína são diferentes, dependendo do ciclo de alterações morfológicas, ao qual a glândula mamária está submetida naquele momento.

Figura 33: Análise da expressão e localização da proteína RECK em amostras de mama de camundongas virgens (A) e lactantes (B).

Amostras teciduais de mama foram coletadas de camundongas virgens e lactantes, do tipo CD-1. Ensaio de imunofluorescência foram realizados para detecção da expressão e localização de RECK e α -SMA, utilizando-se anticorpos específicos para estas proteínas. A proteína α -SMA foi utilizada como marcador de células mioepiteliais. Utilizou-se DAPI para marcação dos núcleos celulares. Nos quadros de combinação tem-se a sobreposição entre as imagens obtidas pela marcação com DAPI (azul), RECK (verde) e α -SMA (vermelho). Fotomicrografia em aumento de 10 e 40x.

4.3. Expressão de RECK em amostras de tumores de mama e seu poder prognóstico de sobrevida de pacientes

O papel da proteína RECK como inibidor de invasão e metástase já é bem conhecido. Estudos realizados com amostras tumorais derivadas de diferentes

tecidos demonstram que, de modo geral, a expressão deste inibidor de MMPs é diminuída ao longo da progressão tumoral. Pacientes diagnosticados com tumores positivos para a expressão de RECK apresentam maior tempo de sobrevida. Dessa forma, RECK vem sendo estabelecido como um indicador de bom prognóstico para diversos tipos de câncer.

Entretanto, até o presente momento, o perfil de expressão de RECK ainda não é muito claro no câncer de mama. No presente trabalho, foi avaliada a expressão de RECK, ao nível protéico, em 1040 amostras de tumores mamários humanos, através de reações de imunohistoquímica, em lâminas de *Tissue Microarray*.

4.3.1. Detecção dos níveis de expressão protéica de RECK em ensaios *Tissue Microarray*

As doze lâminas de *Tissue Microarray* (TMA) utilizadas neste estudo foram construídas e disponibilizadas pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Nestas lâminas, distribuíram-se os 1040 casos de tumores de mama, de diferentes subtipos histológicos, tendo-se, em conjunto, pelo menos três amostras representativas para cada um dos casos analisados, conforme previamente descrito no item 3.16 dos Materiais e Métodos.

A porcentagem de células com marcação positiva para RECK, presente na massa tumoral, foi determinada por meio do programa computacional ScanScope (item 3.16 dos Materiais e Métodos). Amostras com positividade inferior ou igual a 10% foram consideradas negativas para a expressão de RECK. Por sua vez, tumores que apresentaram mais de 10% de células marcadas para RECK foram classificados

como positivos para a expressão deste inibidor de MMPs. Na Figura 34, são apresentados exemplos de amostras dispostas como negativa e positiva.

Figura 34: Padrão de marcação da proteína RECK nas amostras de tumores de mama incluídas nos ensaios de *Tissue Microarray*.

Reação de imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-RECK. Campo representativo da lamina de *Tissue Microarray* com amostras de baixa (esquerda) e alta (direita) marcação da proteína RECK.

O perfil de marcação para a proteína RECK em amostras de tecido de mama em proliferação benigna (epiteliose), carcinoma ductal *in situ* (DCIS) e em amostras de tumores invasivos são apresentados na Figura 35. Em todos estes distintos tecidos mamários humanos, foi observada expressão da proteína RECK, predominantemente, em células epiteliais, não sendo detectada marcação significativa no estroma.

Epiteliose

Carcinoma Ductal *in situ* (DCIS)

Tumor invasivo

Figura 35: Imagens de imunohistoquímica representativas do perfil de expressão da proteína RECK detectado em amostras teciduais de mama.

Epiteliose (proliferação epitelial benigna), carcinoma ductal *in situ* (DCIS) e tumor invasivo, analisadas em ensaios de *Tissue Microarray*.

4.3.2. Relação entre a expressão de RECK e os dados clínico-patológicos dos tumores mamários analisados nos ensaios de *Tissue Microarray*

Para cada uma das 1040 amostras tumorais incluídas nas lâminas de *Tissue Microarray* foram levantados os dados clínicos e patológicos referentes às pacientes, através da análise detalhada dos prontuários disponibilizados pelo Hospital A. C. Camargo. As informações obtidas incluem: idade da paciente no momento do diagnóstico, tamanho do tumor, expressão dos receptores hormonais de estrógeno (ER) e progesterona (PR), tipo histológico, número de linfonodos comprometidos, *status* hormonal, estadiamento do tumor segundo o sistema de classificação SBR e TNM, expressão dos biomarcadores para tumores de mama já estabelecidos (p53, Her-2, CK8, CK18, CK5,6, CK14 e EGFR), ocorrência de recidiva da doença, tempo de seguimento e tempo de sobrevida das pacientes.

Posteriormente, investigou-se a correlação entre os dados de expressão de RECK e os dados clínicos e patológicos destes tumores, através de análises estatísticas por meio de testes de chi-quadrado (Tabela 6). Dentre as características avaliadas, verificou-se uma relação estatisticamente significativa ($p=0.02232$) entre os níveis de expressão de RECK e o tamanho do tumor no momento diagnóstico, sendo que um maior número de tumores menores de 5cm são positivos para a proteína RECK.

Tabela 6: Correlação entre os dados clínicos e patológicos e o nível de expressão da proteína RECK detectado em amostras de tumores de mama, através de ensaios de *Tissue Microarray*.

Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$), n° RECK neg./baixa (%) representam o número (e porcentagem) de amostras negativas ou com baixa positividade para proteína RECK, n° RECK alta (%) indicam o número (e porcentagem) de amostras com alta positividade para proteína RECK, e χ^2 corresponde ao coeficiente obtido no teste de chi-quadrado.

Parâmetro	nº RECK neg. /baixa (%)	nº RECK alta (%)	χ²	p-valor
<u>Idade no diagnóstico</u>				
<50 anos	297 (31.6%)	643 (68.4%)	1.94	0.1637
≥50 anos	39 (39.0%)	61 (61.0%)		
<u>Status menopausal</u>				
Pré-menopausal	123 (30.4%)	281 (69.6%)	1.27	0.2591
Pós-menopausal	213 (34.0%)	413 (66.0%)		
<u>Tamanho do tumor</u>				
<5 cm	149 (28.8%)	368 (71.2%)	5.22	0.02232
≥5 cm	184 (35.7%)	332 (64.3%)		
<u>Linfonodos comprometidos</u>				
Negativo (N0)	111 (33.5%)	220 (66.5%)	0.21	0.6484
Positivo (N1, N2, N3)	220 (31.9%)	470 (68.1%)		
<u>Recorrência</u>				
Negativa	172 (33.6%)	340 (66.4%)	0.76	0.3828
Positiva	157 (30.8%)	352 (69.2%)		
<u>Status ER/PR</u>				
ER+/PR+	138 (33.4%)	275 (66.6%)	4.10	0.251
ER+/PR-	76 (36.0%)	135 (64.0%)		
ER-/PR+	3 (15.8%)	16 (84.2%)		
ER-/PR-	87 (30.7%)	196 (69.3%)		
<u>Grau SBR</u>				
1	55 (34.8%)	105 (65.2%)	6.03	0.04914
2	203 (29.3%)	386 (70.7%)		
3	76 (26.5%)	211 (73.5%)		
<u>Estadio do tumor</u>				
1	31 (55.4%)	25 (44.6%)	14.88	0.001925
2A e 2B	132 (32.4%)	275 (67.6%)		
3A, 3B e 3C	146 (30.4%)	335 (69.6%)		
4	27 (29.0%)	66 (71.0%)		

Além disso, os resultados obtidos nestes testes estatísticos demonstraram que o *status* de RECK, detectado nas amostras tumorais presentes nas lâminas de *Tissue Microarray*, relaciona-se significativamente ($p < 0.05$) com o estadiamento destes tumores, tanto para o sistema SBR de classificação como para o TNM (Tabela 6). Uma porcentagem significativamente maior ($p = 0.04914$) de amostras tumorais de alto grau SBR (grau 3) são positivas para a proteína RECK. Do mesmo modo, um número significativo ($p = 0.001925$) de tumores de estadio TNM 4 expressam este inibidor de MMPs. Estes resultados indicam que a expressão da proteína RECK esta relacionada à maior agressividade de tumores de mama, dado que este se mostrou mais expresso em tumores de estadio mais avançado (Tabela 6).

Testes de chi-quadrado também foram realizados para avaliação de uma possível correlação entre os dados de positividade para a proteína RECK e a expressão de importantes biomarcadores moleculares de tumores de mama (Tabela 7). Dessa maneira, observou-se que a presença de RECK correlaciona-se significativamente com a marcação positiva dos receptores com atividade de tirosina quinase do tipo I, Her-2 ($p = 0.011$) e EGFR ($p < 0.001$). Uma parte significativa ($p = 0.002$) dos tumores positivos para a expressão do marcador de células luminais CK18, expressam RECK. A porcentagem de tumores RECK positivos também foi significativamente maior ($p < 0.001$) em amostras marcadas com as citoqueratinas 5 e 6, clássicos marcadores do fenótipo mesenquimal. Além disso, foi verificado que a expressão do supressor de tumor p53 também está relacionada aos níveis de RECK, nas amostras de tumores de mama analisadas. Assim, a presença de RECK é significativamente ($p < 0.001$) mais freqüente em tumores p53 positivos (Tabela 7).

Tabela 7: Correlação entre o *status* de biomarcadores e o nível de expressão da proteína RECK detectado em amostras de tumores de mama, através de ensaios de *Tissue Microarray*.

Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$), n° RECK neg./baixa (%) representam o número (e porcentagem) de amostras negativas ou com baixa positividade para proteína RECK, n° RECK alta (%) indicam o número (e porcentagem) de amostras com alta positividade para proteína RECK, e χ^2 corresponde ao coeficiente obtido no teste de chi-quadrado.

Parâmetro	nº RECK neg./baixa (%)	nº RECK alta (%)	χ²	p-valor
<u>ER</u>				
Positivo	222 (33.8)	435 (66.2)	1.11	0.29
Negativo	96 (30.2)	222 (69.8)		
<u>PR</u>				
Positivo	144 (32.7)	296 (67.3)	0.00	1.00
Negativo	170 (32.9)	346 (67.1)		
<u>HER2</u>				
Positivo	31 (22.6)	106 (77.4)	6.49	0.011
Negativo	257 (34.1)	496 (65.9)		
<u>p53</u>				
Positivo	298 (30.8)	669 (69.2)	14.41	<0.001
Negativo	27 (58.7)	19 (41.3)		
<u>CK5,6</u>				
Positivo	30 (17.6)	140 (82.4)	19.71	<0.001
Negativo	295 (35.5)	536 (64.5)		
<u>CK14</u>				
Positivo	11 (23.4)	36 (76.6)	1.33	0.249
Negativo	311 (32.6)	644 (67.4)		
<u>CK8</u>				
Positivo	318 (32.3)	666 (67.7)	0.72	0.396
Negativo	5 (50)	5 (50.0)		
<u>CK18</u>				
Positivo	263 (30.1)	611 (69.9)	10.03	0.002
Negativo	52 (45.2)	63 (54.8)		
<u>EGFR</u>				
Positivo	29 (15.9)	153 (84.1)	25.32	<0.001
Negativo	289 (35.5)	525 (64.5)		

4.3.3. Relação entre a expressão da proteína RECK e a sobrevida das pacientes incluídas nos estudos de *Tissue Microarray*

A associação entre os níveis de expressão de RECK e o tempo de sobrevida global e livre de doença das pacientes diagnosticadas com tumores de mama, foi analisada em curvas de Kaplan-Meier. Conforme previamente descrito (item 3.17 dos Materiais e Métodos), as amostras de tumores presentes nas lâminas de *Tissue Microarray* foram classificadas em dois grupos: marcação negativa ou baixa e alta marcação para proteína RECK.

O papel de RECK na determinação da sobrevida global e livre de doença destas pacientes foi monitorado até 10 anos após o diagnóstico, dado que a morte ou a recidiva da doença em pacientes, após este período, podem não ser uma decorrência do tumor primário de mama diagnosticado há mais de 10 anos. As amostras de tumores de pacientes com sobrevida superior a 120 meses não foram incluídas neste estudo, remanescendo 748 casos dos 1040 totais avaliados (item 3.16 dos Materiais e Métodos).

Dessa maneira, verificou-se que pacientes com tumores positivos para a expressão de RECK apresentam tempo de sobrevida global (Figura 36A) e livre de doença (Figura 36B) significativamente menor ($p=0.003$ e $p=0.006$, respectivamente), em relação às pacientes diagnosticadas com tumores negativos ou com baixa marcação para este inibidor de MMPs. Portanto, estes dados indicam que a presença de RECK é um indicador de pior prognóstico em modelo de câncer de mama.

Figura 36: Curvas de Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) das pacientes diagnosticadas com tumores mamários, em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As amostras de tumores de pacientes com sobrevida global (A) e livre de doença (B) de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos (marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK). As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$).

Posteriormente, foi avaliado se o poder prognóstico de RECK, na determinação da sobrevida de pacientes com tumores de mama é diferente para tumores diagnosticados em estadios clínicos distintos (Figura 37). Para tanto, as amostras de tumores de mama classificadas de acordo com o grau TNM, foram divididas em dois grupos. Considerou-se tumores de baixo grau aqueles classificados com graus 1, 2A e 2B. Por sua vez, os tumores de alto grau foram avaliados como 3A, 3B, 3C e 4, segundo o sistema TNM. Diferenças entre as curvas de sobrevida global e livre de doença, de pacientes com tumores negativos e positivos para RECK, foram avaliadas nos grupos de tumores de baixo (Figura 37A e 37C) e alto grau (Figura 37B e 37D).

Figura 37: Curvas de Sobrevida Global (A e B) e Sobrevida Livre de Doença (C e D) das pacientes diagnosticadas com tumores mamários de baixo (A e C) e alto (B e D) grau, em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As pacientes foram agrupadas em função do estadio do tumor no momento do diagnóstico como: baixo (1, 2A e 2B) e alto (3A, 3B, 3C e 4) grau. As amostras de tumores de pacientes com sobrevida global (A e B) e livre de doença (C e D) de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos: marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$).

Para os tumores de mama de baixo grau, demonstrou-se que a marcação positiva para a proteína RECK associa-se, significativamente, a menor tempo de

sobrevida global (Figura 37A) e livre de doença (Figura 37C), em comparação aos tumores de menor grau TNM e RECK negativos. Entretanto, nos tumores de mama mais agressivos (alto grau TNM), as curvas de sobrevida obtidas em função dos níveis de marcação de RECK não apresentaram diferenças significativas (Figuras 37B e 37D). Em conjunto, estes resultados sugerem que a expressão de RECK é um indicador de menor tempo de sobrevida apenas para pacientes diagnosticadas com tumores de baixo grau.

O papel de RECK como marcador molecular da sobrevida de pacientes com câncer de mama também foi explorada em função do *status* de marcadores de células epiteliais. Sabendo-se que a detecção da expressão das citoqueratinas 8 e 18 (CK8 e CK18, respectivamente) relaciona-se ao fenótipo luminal, os tumores de mama incluídos neste estudo foram distribuídos em quatro grupos: CK8 positivo, CK8 negativo, CK18 positivo e CK18 negativo. Curvas de sobrevida global (Figura 38) em função da marcação para a proteína RECK (negativa ou baixa e alta) foram construídas para cada um destes quatro subgrupos de tumores.

Pacientes com tumores RECK negativos, apresentam um tempo significativamente maior de sobrevida global quando positivos para CK8 ($p < 0.001$) e CK18 ($p < 0.001$) (Figuras 38A e 38C, respectivamente). Em contrapartida, as curvas de sobrevida global construídas em função dos níveis de expressão de RECK não se mostraram estatisticamente diferentes, para as amostras tumorais negativas para CK8 (Figura 38B) e CK18 (Figura 38D). Dessa forma, foi demonstrado que RECK é um indicador de pior prognóstico apenas para pacientes diagnosticados com tumores positivos para estes marcadores luminiais.

Figura 38: Curvas de Sobrevida Global das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores luminais, CK8 (A e B) e CK18 (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As pacientes foram agrupadas em função do *status*, negativo (B e D) ou positivo (A e C), das citoqueratinas 8 (A e B) e 18 (C e D), marcadores de células epiteliais. As amostras de tumores de pacientes com sobrevida global de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos: marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$).

Resultados similares foram obtidos para os dados de sobrevida livre de doença (Figura 39). A marcação positiva para RECK relacionou-se a menor tempo de

sobrevida livre de recidiva da doença apenas em pacientes com tumores positivos para CK8 ($p=0.003$) e CK18 ($p=0.002$) (Figuras 39A e 39C, respectivamente).

Posteriormente, os perfis das curvas de Kaplan-Meier, construídas em função da marcação para a proteína RECK, foram avaliados em grupos de pacientes diagnosticadas com tumores CK5,6 e CK14 positivos ou negativos. Quatro subgrupos foram gerados considerando-se o *status* destes clássicos marcadores de células mesenquimais.

Os resultados obtidos para as curvas de sobrevida global (Figura 40) corroboram os resultados anteriormente obtidos (Figura 38), pois mostram que RECK é um indicador de pior prognóstico em tumores com características luminais, ou seja, positivos para CK8 e CK18 e negativos para a expressão de CK5,6 e CK14. Assim, pacientes com tumores positivos para RECK, apresentaram tempo de sobrevida global significativamente menor, quando eram negativos para CK5,6 ($p=0.005$) e CK14 ($p=0.003$) (Figuras 40B e 40D, respectivamente). Por sua vez, as pacientes com tumores positivos para os marcadores do fenótipo basal (CK5,6 e CK14) não apresentam sua sobrevida global relacionada, de modo significativo, aos níveis de marcação detectados para RECK (Figuras 40A e 40C).

Figura 39: Curvas de Sobrevida Livre de Doença das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores luminiais, CK8 (A e B) e CK18(C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As pacientes foram agrupadas em função do *status*, negativo (B e D) ou positivo (A e C), das citoqueratinas 8 (A e B) e 18 (C e D), marcadores de células epiteliais. As amostras de tumores de pacientes com sobrevida livre de doença de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos: marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$).

Figura 40: Curvas de Sobrevida Global das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores basais, CK5,6 (A e B) e CK14 (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As pacientes foram agrupadas em função do *status*, negativo (B e D) ou positivo (A e C), das citoqueratinas 5, 6 (A e B) e 14 (C e D), marcadores de células mesenquimais. As amostras de tumores de pacientes com sobrevida global de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos: marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$).

De modo semelhante, foi observado que pacientes diagnosticadas com tumores negativos para RECK apresentam um tempo de sobrevida livre de doença significativamente mais elevado, nos casos em que estes tumores também são negativos para a expressão das citoqueratinas 5, 6 ($p=0.008$) e 14 ($p=0.004$) (Figura 41). Entretanto, a presença ou a ausência da expressão de RECK, em amostras positivamente marcadas para estes indicadores do comportamento celular mesenquimal, não leva a distinções entre o tempo de sobrevida livre de doença destas pacientes (Figura 41).

Finalmente, foi examinado se a expressão da proteína RECK pode ser utilizada como marcador prognóstico, em tumores de mama categorizados de acordo com a expressão dos marcadores moleculares já conhecidos. A marcação positiva para o supressor de tumor p53 vem sendo descrita como um indicador de bom prognóstico para pacientes com tumores de mama Her-2 positivos (Al-Azawi et al., 2010). Por sua vez, altos níveis de expressão do receptor do fator de crescimento EGF (EGFR) estão associados a tumores mais agressivos, com pior curso clínico (Lurje et al, 2009, Modjtahedi et al., 2009, Massarweh et al, 2008).

As amostras de tumores incluídas neste estudo foram agrupadas de acordo com a presença ou a ausência de expressão das proteínas p53 e EGFR. Curvas de Kaplan-Meier para cada um desses quatro grupos (p53 positivo, p53 negativo, EGFR positivo e EGFR negativo) foram construídas para análise dos tempos de sobrevida global (Figura 42) e livre de doença (Figura 43) destas pacientes, em função da marcação diferencial para a proteína RECK (marcação fraca ou forte).

Figura 41: Curvas de Sobrevida Livre de Doença das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão de marcadores basais, CK5, 6 (A e B) e CK14 (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As pacientes foram agrupadas em função do *status*, negativo (B e D) ou positivo (A e C), das citoqueratinas 5, 6 (A e B) e 14 (C e D), marcadores de células mesenquimais. As amostras de tumores de pacientes com sobrevida livre de doença de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos: marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$)

Os dados gerados nestas análises demonstram que a positividade para RECK é um indicador de menor tempo de sobrevida, para pacientes diagnosticadas com

tumores positivos para p53 (Figuras 42 e 43). As sobrevidas, global ($p=0.004$) e livre de doença ($p=0.009$), foram significativamente maiores para tumores negativos para expressão de RECK. Por sua vez, o poder prognóstico de RECK é perdido em tumores p53 negativos, dado que as curvas de sobrevida global (Figura 42) e livre de doença (Figura 43) nestas pacientes, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao *status* deste inibidor de MMPs.

Posteriormente, as amostras de tumores avaliadas neste estudo foram classificadas de acordo com a expressão de EGFR. Através das análises de sobrevida das pacientes com tumores positivos e negativos para este receptor de EGF, foi possível mostrar que RECK é um marcador de pior prognóstico apenas para tumores negativos para EGFR (Figuras 42 e 43, respectivamente).

Figura 42: Curvas de Sobrevida Global das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão dos biomarcadores p53 (A e B) e EGFR (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As pacientes foram agrupadas em função do *status*, negativo (B e D) ou positivo (A e C), das proteínas p53 (A e B) e EGFR (C e D). As amostras de tumores de pacientes com sobrevida global de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos: marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$).

Figura 43: Curvas de Sobrevida Livre de Doença das pacientes diagnosticadas com tumores positivos (A e C) e negativos (B e D) para a expressão dos biomarcadores p53 (A e B) e EGFR (C e D), em função da expressão da proteína RECK detectada em ensaios de *Tissue Microarray*.

As pacientes foram agrupadas em função do *status*, negativo (B e D) ou positivo (A e C), das proteínas p53 (A e B) e EGFR (C e D). As amostras de tumores de pacientes com sobrevida livre de doença de até 10 anos foram incluídas neste estudo. Os tumores foram classificados em dois grupos: marcação negativa ou baixa e marcação alta, para a proteína RECK. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste estatístico de log-rank. Os valores de p em destaque indicam as correlações consideradas significativas ($p \leq 0.05$).

O tempo de sobrevida global ($p=0.013$) e livre de doença ($p=0.011$) das pacientes diagnosticadas com tumores não marcados para EGFR é significativamente maior quando também não são marcados para RECK (Figuras 42 e 43,

respectivamente). De modo contrário, as amostras positivas para EGFR não apresentam diferenças significativas, entre as curvas de sobrevida (global e livre de doença) construídas em função da presença ou ausência de níveis detectáveis da proteína RECK.

Em conjunto, estes resultados sugerem que a expressão positiva da proteína RECK é indicador de menor tempo de sobrevida apenas em tumores p53 positivos e EGFR negativos.

4.4. Análise funcional de RECK em células de carcinoma mamário humano altamente invasivas

Os resultados obtidos nos ensaios de TMA indicam que a expressão RECK é um indicador de menor tempo de sobrevida em modelo de câncer de mama. Estes dados opõem-se àqueles verificados para outros tipos de tumor, nos quais RECK é um marcador de melhor prognóstico. Dado seu distinto perfil de expressão, a análise da função da proteína RECK em modelo mamário, faz-se necessária para o esclarecimento de seu papel neste tecido. Neste contexto, tem-se como um dos objetivos deste trabalho, o estudo funcional deste inibidor de MMPs em células de carcinoma mamário humano.

4.4.1. Expressão da proteína RECK em linhagens celulares de mama humana

Primeiramente, foi avaliado o perfil de expressão protéico de RECK em um painel com seis linhagens da mama humana, através de ensaios de *Western-Blotting* (Figura 44). Neste painel, tem-se: uma linhagem derivada de tecido mamário normal

(células S1), duas linhagens de carcinoma mamário não invasivas (células MCF-7 e T47D) e três linhagens celulares tumorais com significativo potencial invasivo (células T4-2, MDA-MB-231 e Hs578T).

Foi verificado que células com maior capacidade invasiva apresentam maiores níveis de expressão da proteína RECK, em relação às células normais de mama e às linhagens tumorais não invasivas (Figura 44). A linhagem Hs578T expressa níveis significativamente mais elevados de RECK ($p < 0.001$), em comparação à linhagem não tumorigênica S1. Além disso, a expressão da proteína RECK é significativamente maior nas células de caráter invasivo T4-2 ($p < 0.05$), MDA-MB-231 ($p < 0.01$) e Hs578T ($p < 0.001$), em relação às linhagens não invasivas (MCF-7 e T47D) (Figura 44).

Figura 44 – Níveis de expressão da proteína RECK em um painel de seis linhagens mamárias humanas, incluindo: células não tumorigênicas (S1), células não invasivas (MCF-7 e T47D) e linhagens invasivas (T4-2, MDA-MB-231 and Hs578T).

Extratos protéicos totais destas linhagens celulares foram utilizados para a quantificação dos níveis de expressão da proteína RECK através de ensaios de *Western-blotting*. A proteína Lamin A/C foi usada como controle interno destes ensaios. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em pelo menos três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* mostram os resultados obtidos em um experimento representativo. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Dado o importante papel dos elementos da matriz extracelular e do microambiente tridimensional nos mecanismos de progressão tumoral do câncer de mama, avaliou-se a expressão protéica de RECK em modelo de cultura celular em três dimensões (cultura 3D) (Figura 45).

Com este intuito, primeiramente compararam-se os níveis de expressão da proteína RECK em células cultivadas em 3D, àqueles de células de mama submetidas ao tradicional cultivo em monocamada (2D) (Figura 45A). Dessa forma, modelos celulares não tumorigênicos (S1) e tumorais (T4-2) foram mantidos em ambas as condições de cultivo (2D e 3D), segundo protocolo previamente descrito no item 3.4 dos Materiais e Métodos. Extratos protéicos totais, obtidos destas linhagens, foram utilizados para análise da expressão de RECK, em ensaios de *Western-Blotting*. A expressão da proteína Lamina A/C foi utilizada como controle interno destes ensaios. Os resultados apresentados na Figura 45A apontam que a expressão da proteína RECK não é alterada pelo cultivo celular em três dimensões, tanto na linhagem normal (S1) como tumoral (T4-2) de mama.

Posteriormente, foi avaliado o perfil de expressão de RECK no modelo de reversão fenotípica tumoral-normal das células T4-2, em cultura 3D (Figura 45B). Este modelo foi estabelecido, caracterizado e disponibilizado pela Professora Dra. Mina J. Bissell, do Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California. Este grupo de pesquisa demonstrou que a linhagem de mama T4-2, apenas quando cultivada em membrana basal reconstituível, tem seu fenótipo tumoral revertido para normal, por meio do tratamento com 100nM de um inibidor farmacológico de EGFR (Tyrphostin).

Figura 45: Expressão da proteína RECK em linhagens de mama normal (S1), tumoral (T4-2) e tumoral revertida (T4-2 tratada com *Tyrphostin*) cultivadas em monocamada (2D) e em três dimensões (3D).

(A) Níveis de expressão da proteína RECK em células S1 e T4-2, mantidas em cultura em duas e três dimensões. (B) Expressão protéica de RECK nas células S1, T4-2, e T4-2 submetida à reversão fenotípica tumoral-normal através do tratamento com inibidor farmacológico de EGFR. Os extratos protéicos totais das linhagens celulares submetidas a estas condições de cultivo e tratamento foram utilizados para a quantificação dos níveis de expressão da proteína RECK, através de ensaios de *Western-blotting*. A proteína Lamina A/C foi usada como controle interno destes ensaios. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* mostram os resultados obtidos em um experimento representativo. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Tem-se que: ns: diferenças não estatisticamente significativas.

Através da realização de ensaios de *Western-blotting*, usando-se a expressão protéica de Lamina A/C como controle interno, foi demonstrado que os níveis de RECK não são modulados neste modelo de progressão tumoral em três dimensões (Figura 45B). Dessa maneira, não foram detectados níveis significativamente distintos de expressão desta proteína nas células S1, T4-2 e T4-2 tratada com inibidor de EGFR, quando cultivadas em três dimensões (Figura 45B).

4.4.2. Inibição da expressão de RECK, por meio da metodologia de RNA de interferência, na linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-231

Diferentemente do observado em linhagens celulares derivadas de outros tipos de tumor, a proteína RECK é mais expressa em células tumorais de mama mais agressivas (Figura 44). Por ser classicamente descrita, em outros modelos, como um inibidor de MMPs, invasão e metástase, surge a dúvida se esta proteína desempenha a mesma função em modelo mamário humano. Neste sentido, investigou-se o papel de RECK em células de carcinoma mamário humano, de alto caráter invasivo e metastático. Para tanto, foi utilizada, como modelo de estudo, a linhagem MDA-MB-231, na qual elevados níveis de expressão transcricional (Figura 12) e protéico (Figura 44) de RECK foram detectados.

Através da metodologia de RNA de interferência, foram geradas células MDA-MB-231 deficientes para a expressão de RECK. Para alcançar este objetivo, foram produzidas partículas lentivirais detentoras de vetores recombinantes capazes de expressar seqüências de shRNA específicas para a inibição de RECK, conforme descrito no item 3.15 dos Materiais e Métodos. Cinco diferentes seqüências de shRNA foram testadas (seqüências shRECK 23 a 27). Além da infecção com partículas específicas para RECK (shRECK), também foram geradas células infectadas com uma seqüência de shRNA *scramble*. Por ser incapaz de interagir com qualquer seqüência de RNA mensageiro expresso em humanos, a seqüência *scramble* foi utilizada como controle experimental.

A morfologia das linhagens geradas pela infecção das células MDA-MB-231 com as distintas seqüências de shRNA para inibição de RECK (shRECK 23 a 27), ou com o controle *scramble*, é apresentada na Figura 46. Nenhuma alteração

morfológica significativa foi observada. Notou-se apenas uma aparente diferença entre as densidades celulares de saturação apresentadas por estas linhagens (Figura 46).

Figura 46: Morfologia das linhagens de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 RECK deficientes geradas pela metodologia de RNA de interferência.

As células MDA-MB-231 foram infectadas com partículas lentivirais detentoras de vetores de expressão para diferentes seqüências shRNA específicas para a inibição de RECK (shRECK 23, shRECK 24, shRECK 25, shRECK 26 e shRECK27). A linhagem infectada com o vetor de expressão para a seqüência *scramble* foi utilizada como controle. Fotomicrografias em aumento de 10x.

Para a confirmação da inibição da expressão de RECK nas células MDA-MB-231 infectadas, foram realizados ensaios de RT-PCR quantitativo (Figura 47A) e *Western-Blotting* (Figura 47B). Dessa maneira, verificou-se que todas as seqüências de shRNA testadas para a inibição de RECK (shRECK 23 a 27) foram capazes de diminuir, de modo significativo ($p < 0.05$), tanto a expressão de mRNA como os níveis

protéicos de RECK, em relação as células infectadas com o controle *scramble* (Figura 47).

Entretanto, sabe-se que para realização da análise funcional de um determinado gene, faz-se necessária a geração de células com níveis de expressão reduzidos em ao menos 70%, em relação aos das células controle. Neste contexto, a inibição da expressão gênica de RECK foi igual ou superior a 70% somente nas células MDA-MB-231 infectadas com as seqüências de shRNA 24, 25 e 26 (Figura 47A). Por sua vez, a expressão da proteína RECK foi 70% menor, em relação ao controle *scramble*, exclusivamente nas células infectadas com as seqüências shRECK 24 e 26. A máxima inibição de RECK foi alcançada na linhagem MDA-MB-231 shRECK 26, obtendo-se níveis expressão protéica próximos a 20% da detectada na linhagem controle (Figura 47B). Dessa forma, nos ensaios funcionais realizados a seguir, utilizaram como modelo de estudo, as células MDA-MB-231 infectadas com a seqüência 26 de shRECK (Figuras 48, 49 e 50).

Figura 47: Expressão de mRNA e proteína de RECK na linhagem MDA-MB-231 infectada com lentivírus recombinantes detentores de diferentes seqüência shRNA específicas para RECK (shRECK 23 a 27) ou uma seqüência controle shRNA *scramble*.

(A) Expressão de mRNA de RECK determinada por ensaios de qRT-PCR utilizando a expressão do RNA ribossomal 18S como controle endógeno. (B) Ensaios de *Western-blotting* para determinação da expressão da proteína RECK usando a expressão de β-Actina como normalizador. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos dois experimentos independentes. As imagens de *Western-blotting* mostram os resultados obtidos em um experimento representativo. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. **, $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, todos em relação ao controle (*scramble*).

4.4.3. Capacidade invasiva e expressão de MMP-9 em células MDA-MB-231 deficientes em RECK

Gerada a linhagem deficiente para a expressão de RECK, foi investigado o papel desta proteína no fenótipo invasivo da linhagem MDA-MB-231 (Figura 48). Para tanto, foram realizados ensaios de invasão *in vitro* para comparação da capacidade invasiva de células infectadas com a seqüência *scramble* de shRNA, ou com a seqüência shRECK 26. As células não invasivas S1, foram utilizadas como controle negativo destes ensaios. Estas linhagens foram plaqueadas sobre insertos do tipo Transwell™, revestidos com MATRIGEL®, e mantidas em cultura por 24h.

Após este período, determinou quantas células foram capazes de degradar os elementos da matriz extracelular, presente nesta membrana basal reconstituível, e migrar para a porção inferior destes insertos.

Figura 48: Ensaios de invasão em Transwell™ para avaliação do potencial invasivo das células MDA-MB-231 deficientes para a expressão de RECK (shRECK 26) e controle *scramble*, na presença ou na ausência de um inibidor farmacológico de MMPs (GM6001).

Células MDA-MB-231 RECK deficientes (shRECK 26) e infectadas com sequência controle *scramble* foram mantidas em insertos, revestidos com membrana basal reconstituível (MATRIGEL®), por 36h, na presença de 40μM do inibidor de MMPs (GM6001) ou de seu veículo (DMSO). As células presentes na porção inferior desses insertos foram fixadas e coradas. Com auxílio do programa computacional Image J determinou-se a porção do transwell revestido de células para cada uma das condições experimentais. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. **, $p < 0.01$.

Além da análise da função de RECK na determinação do caráter invasivo da linhagem MDA-MB-231, também foi investigado o envolvimento das MMPs neste processo. Com este intuito, as células controle *scramble* e shRECK foram tratadas

com um inibidor de MMPs de amplo espectro (GM6001) ou com seu veículo (DMSO). Os resultados obtidos demonstram que a linhagem MDA-MB-231 RECK deficiente apresenta potencial invasivo significativamente aumentado ($p < 0.01$), em comparação com a linhagem controle (Figura 48). Além disso, o tratamento com GM6001 levou à reversão significativa deste fenótipo ($p < 0.01$), sugerindo que as MMPs desempenham papel fundamental neste mecanismo de indução de invasão mediado pela inibição de RECK (Figura 48).

RECK é sabidamente descrito como um inibidor de metaloproteinases de matriz, em outros tipos de tecido. Dentre as MMPs reguladas por RECK, destaca-se a MMP-9, por ser a única modulada ao nível transcricional. Assim sendo, posteriormente, foram avaliados os níveis de expressão de mRNA (Figura 49A) e proteína (Figura 49B), correspondentes a MMP-9, nas células MDA-MB-231 RECK deficientes e controle *scramble*.

Figura 49: Expressão de MMP-9 nas células MDA-MB-231 deficientes para a expressão de RECK (shRECK 26) e nas células controle infectadas com a sequência *scramble* de shRNA.

(A) Ensaios de RT-PCR quantitativo foram realizados para determinação da expressão de mRNA de MMP-9, utilizando-se a expressão do RNA ribossomal 18S como controle endógeno. (B) Os níveis de expressão da proteína MMP-9, em sua forma ativa e de pró-enzima, foram analisadas em ensaios de Zimografia. O número de células em cada uma das condições experimentais foi utilizado como controle interno destes ensaios. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos três experimentos independentes. As imagens de Zimografia mostram os resultados obtidos em um experimento representativo. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste t. Tem-se que: **, $p < 0.01$, todos em relação ao controle (*scramble*).

Através de ensaios de RT-PCR quantitativo, utilizando-se a expressão do RNA ribossomal 18S como controle endógeno, detectaram-se níveis de expressão gênica de MMP-9 significativamente ($p < 0.01$) maiores nas células MDA-MB-231 RECK deficientes, em relação aos valores obtidos nas células infectadas com a sequência controle *scramble* (Figura 49A).

Por sua vez, para exame dos níveis de expressão da proteína MMP-9, em sua forma ativa e de pró-enzima, foram realizados ensaios de Zimografia (Figura 49B). Foi observado que os níveis da pró-enzima MMP-9 são significativamente maiores ($p < 0.01$) nas células infectadas com a sequência shRECK 26, em comparação às células controle (Figura 49B). Entretanto, não foi detectada diferença significativa entre os valores de expressão de MMP-9, em sua forma ativa, nestas linhagens (Figura 49B).

4.4.4. Análise do crescimento celular da linhagem MDA-MB-231 RECK deficiente

Em seguida, foi investigada a capacidade proliferativa das células MDA-MB-231 RECK deficientes. Para tanto, ensaios de curva de crescimento (Figura 50A) e de formação de colônia (Figura 50B) foram realizados. O mesmo número de células MDA-MB-231 infectadas com a sequência shRECK 26 ou com o controle *scramble* foram plaqueadas, em triplicata, para ambos os ensaios, como descrito nos itens 3.5 e 3.6 dos Materiais e Métodos, respectivamente.

Figura 50: Análise do potencial proliferativo de células MDA-MB-231 RECK deficientes (shRECK 26) e controle *scramble*, através de ensaios de curva de crescimento e formação de colônia.

(A) Ensaios de curva de crescimento foram realizados plaqueando-se 5×10^3 células/cm² da linhagem MDA-MB-231 infectadas com lentivírus recombinantes detentores da seqüência shRECK 26 ou do controle *scramble*. Após 1, 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo em meio RPMI com 10% soro fetal bovino, estas células foram coletadas, fixadas e contadas. (B) Em ensaios de formação de colônia as células foram coradas e fixados 9 dias após o plaqueamento em baixa densidade celular (1×10^2 células/cm²). O número de colônias formadas em cada uma dessas condições foi contado. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos três experimentos independentes, realizados em triplicata. As imagens das colônias celulares mostram os resultados obtidos em um experimento representativo. (B). As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste t.

Nos ensaios de curva de crescimento, as células foram coletas, fixadas e contadas após 1, 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo. Os dados apresentados na Figura 50A apontam que não há uma diferença significativa entre as curvas de crescimento obtidas para as células MDA-MB-231 RECK deficiente e controle *scramble*. Do mesmo modo, os resultados obtidos nos ensaios de formação de colônia, no qual as células foram fixadas e coradas após 9 dias em cultura, mostram que o número de colônias formadas pelas linhagens shRECK 26 e *scramble* não é significativamente diferente (Figura 50B). Em conjunto, estes resultados indicam que a proteína RECK não desempenha função alguma sobre o crescimento celular na linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-231.

5. DISCUSSÃO

5.1. TGF- β 1 como modulador comum da expressão de MMPs e seus inibidores

5.1.1. Correlação entre os níveis de expressão gênica de MMPs, TIMPs e RECK e a capacidade invasiva e metastática de linhagens celulares de carcinoma mamário humano

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a expressão gênica de MMP-2 e MMP-14 correlaciona-se positivamente com a capacidade invasiva e metastática de linhagens celulares de carcinoma mamário humano (Figura 11). Estes resultados corroboram, de maneira geral, dados anteriormente obtidos pelo nosso laboratório (Figueira et al., 2009), exceto pelo perfil de expressão de MMP-9. Em oposição ao que foi anteriormente observado, no presente trabalho, verificou-se que a expressão gênica de MMP-9 é significativamente menor em células invasivas e metastáticas, em relação às linhagens menos agressivas. Tal contradição, provavelmente ocorreu em virtude de diferenças entre as condições de manutenção das linhagens celulares utilizadas, no momento da extração de RNA.

Sabe-se que, em modelo mamário humano, a expressão gênica de alguns membros da família das MMPs e dos TIMPs varia de acordo com a densidade celular (Bachmeier et al., 2005). Bachmeier e colaboradores demonstraram, em células MDA-MB-231 e MDA-MB-435 (incluídas no painel de linhagens analisado neste estudo), que os níveis de expressão destas moléculas são inversamente proporcionais à confluência celular.

Neste contexto, diferentemente do desenho experimental utilizado em nosso trabalho anterior (Figueira et al., 2009), no qual as linhagens foram mantidas em cultura pelo mesmo período de tempo (três e cinco dias), no atual estudo, a extração do RNA total correspondente às diferentes linhagens de mama, foi realizada quando estas atingiram a mesma confluência celular (80-90%). Tal estratégia mostrou-se ainda mais conveniente, pois as cinco linhagens estudadas (MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-435 e Hs578T) apresentam densidades de saturação e tempos de dobramento distintos.

Outro motivo que pode ter contribuído para a discordância entre os resultados de expressão gênica de MMP-9, refere-se ao controle endógeno utilizado nos ensaios de RT-PCR quantitativo. Os dados anteriores foram obtidos utilizando-se a expressão de GAPDH como normalizador. Por sua vez, todos os resultados de expressão gênica, aqui apresentados, foram normalizados pelo Fator de Normalização GeNorm, calculado a partir dos valores de expressão gênica de HPRT e HMBS.

No presente trabalho, primeiramente determinou-se o melhor controle endógeno, dentre genes avaliados (GAPDH, HPRT e HMBS), por meio da submissão de seus respectivos níveis de expressão relativa ao programa computacional GeNorm (Vandesompele et al., 2002). Dado que os níveis de expressão de mRNA de GAPDH foram classificados como menos estáveis, em relação aos outros genes testados, este foi descartado para o cálculo do Fator de Normalização.

Além disso, relatos prévios da literatura indicam que a expressão de genes, freqüentemente utilizados como controles endógenos, varia em função da densidade

celular. Dessa forma, demonstrou-se, em modelo mamário humano, que a expressão de GAPDH é menor em culturas celulares mantidas em maior confluência. Por sua vez, dentre os genes testados (CPD, PBGD, GAPDH, G-6-P, e HPRT), apenas HPRT não se mostrou diferencialmente expresso em confluências distintas (Bachmeier et al., 2005).

À princípio, a detecção de baixos níveis de expressão gênica de MMP-9, em linhagens de alto caráter invasivo e metastático, parece contraditório. Entretanto, tal incoerência pode ser devida à alta expressão RECK, também detectada nestas células (Figuras 12 e 44). Sabe-se que RECK exerce sua função como inibidor de metaloproteinases de matriz, por meio da inibição da secreção e da atividade enzimática das MMPs. Contudo, recentemente, foi descrito que RECK também é capaz de inibir MMP-9 ao nível transcricional (Takagi et al., 2009).

Maiores níveis de expressão de mRNA dos inibidores de MMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK), também foram detectados nas células tumorais de mama mais agressivas (Figura 12). Embora primeiramente descritos como moléculas inibidoras do processo invasivo e metastático, altos níveis de expressão dos TIMPs estão associados, em modelo tumoral mamário, a prognósticos adversos e à agressividade celular (Figueira et al., 2009; Kuvaja et al., 2007; Liss et al., 2009; Nakopoulou et al., 2002). Mais recentemente, foram identificadas novas funções desempenhadas pelos TIMPs (Lambert et al., 2004). Atualmente, tais moléculas são descritas como multifuncionais, exercendo não apenas funções associadas à inibição da progressão tumoral, mas, também, assumindo um papel oncogênico, por meio da regulação da morte e proliferação celular (Lambert et al., 2004).

Por sua vez, muitas são as evidências que suportam o papel de RECK como um marcador molecular de bom prognóstico em diferentes tipos de tumores. De modo geral, a expressão de RECK é inibida ao longo da progressão tumoral, em alguns tipos de tumor, tais como: carcinoma de pâncreas, hepatocarcinoma, carcinoma de pulmão e colorectal (Noda e Takahashi, 2007). Entretanto, nossos resultados indicam que RECK é mais expresso em linhagens mais agressivas (Figuras 12 e 44). Logo, surge a dúvida se esta molécula assume o mesmo papel em modelo mamário humano. Para o seu esclarecimento, realizou-se a análise funcional de RECK em câncer de mama.

Em conjunto, os resultados apresentados sugerem que a transformação maligna mamária, associada à progressão de células normais por estadios pré-malignos até cânceres invasivos, é acompanhada pelo aumento da expressão de MMPs e de seus inibidores (TIMPs e RECK).

5.1.2. Expressão gênica das isoformas e receptores de TGF- β em linhagens de carcinoma de mama humano com graus de malignidade distintos

O importante papel de TGF- β durante os múltiplos estágios da progressão tumoral já é bem estabelecido pela literatura. Entretanto, o perfil de expressão e a atividade das moléculas envolvidas nos mecanismos de sinalização desta citocina, ainda permanecem pouco elucidados (Bierie e Moses, 2009; Padua e Massague, 2009). Os receptores de TGF- β e seus correspondentes transdutores de sinal são freqüentemente perdidos, mutados ou atenuados em cânceres humanos, incluindo tumores pancreáticos, gástricos e de cólon (Bierie e Moses, 2009; Padua e Massague, 2009). Por sua vez, em outros tipos de tumores, como no caso da neoplasia mamária, a freqüência de mutação em genes codificadores para estas moléculas, é

significativamente menor. Contudo, alterações em seus níveis de expressão são comumente detectadas em tumores de mama (Desruisseau et al., 2006; Figueroa et al.; Ivanovic et al., 2003; Padua and Massague, 2009; Paiva et al., 2010).

Poucos trabalhos realizaram uma análise abrangente sobre a expressão de receptores e isoformas de TGF- β , bem como de seus transdutores de sinal intracelulares. Muitas vezes, estes estudos se restringiram à avaliação de apenas um membro da via de TGF- β , num conjunto de amostras teciduais. Dada a escassa informação disponível sobre a expressão gênica dessas moléculas em modelos celulares, foi realizado, pela primeira vez, uma caracterização geral do perfil de expressão gênica das isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e receptores (T β RI e T β RII) de TGF- β , em um painel de cinco linhagens de carcinoma mamário humano (MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-435 e Hs578T) apresentando potenciais invasivos e metastáticos distintos.

Nossos resultados mostram que, de modo geral, assim como verificado para expressão gênica de MMPs, TIMPs e RECK, os níveis de mRNA das isoformas e receptores de TGF- β apresentam-se aumentados em linhagens tumorais de mama mais agressivas, em comparação com as células de menor caráter invasivo (Figura 13). Estes dados corroboram relatos prévios da literatura, obtidos em amostras teciduais de tumores de mama, indicando que, neste modelo, a via de TGF- β está relacionada a funções pró-oncogênicas e promotoras de tumor (Ganapathy et al., 2010; Hoshino et al., 2011; Wiercinska et al., 2010).

No entanto, em oposição às outras moléculas avaliadas, a isoforma três de TGF- β (TGF- β 3) mostrou-se menos expressa nas linhagens MDA-MB-435, MDA-MB-

231 e Hs578T do que nas linhagens MCF-7 e ZR-75-1 (Figura 13A). Tal perfil de expressão pode ser devido às funções antitumorais, recentemente descritas para TGF- β 3, numa variedade de tecidos, incluindo mama (Lavery et al., 2009).

Observou-se uma correlação positiva e estatisticamente significativa, entre os níveis de expressão de mRNA das MMPs, inibidores de MMPs, isoformas e receptores de TGF- β avaliados (Tabelas 3, 4 e 5). Observou-se correlações positivas estabelecidas entre a expressão de mRNA de TGF- β 1 e os níveis transcricionais de MMP-2, MMP-14, TIMP-1, TIMP-3 e RECK (Tabela 4). Estes resultados, juntamente com os indícios de regulação da expressão de alguns membros da família das MMPs e dos TIMPs por TGF- β 1, em outros modelos celulares, reforçam a hipótese testada neste trabalho, na qual TGF- β 1 atuaria como um modulador comum da expressão das MMPs, TIMPs e RECK (Hall et al., 2003; Kim et al., 2008; Lee et al., 2008; Leivonen et al., 2002; Ottaviano et al., 2006; Sun et al., 2008).

5.1.3. A escolha do modelo celular utilizado para estudo da ação de TGF- β 1 na regulação da expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK)

TGF- β 1 apresenta função ambígua no desenvolvimento neoplásico, pois atua tanto como um inibidor de crescimento celular, em estágios precoces da transformação maligna, como na promoção da transição epitélio-mesênquima (EMT), invasão e metástase, em estágios mais tardios (Akhurst and Derynck, 2001; Derynck et al., 2001; Gomes et al., 2011; Pardali and Moustakas, 2007). Esta resposta celular contexto-dependente, é induzida por TGF- β 1 tanto em condições fisiológicas,

quanto patológicas. Dessa forma, células tumorais com agressividades distintas, respondem de maneira diferente ao tratamento com TGF- β 1.

As linhagens de carcinoma mamário humano MCF-7 (pouco invasivas) e MDA-MB-231 (altamente invasivas) são exemplos deste papel dual de TGF- β 1 ao longo da progressão tumoral. Neste caso, a perda da expressão do receptor de estrógeno (RE) e a superexpressão do proto-oncogene *ras*, duas alterações moleculares muito comumente relacionadas à progressão do câncer de mama, são sugeridos como alguns dos fatores envolvidos na alteração da resposta fenotípica ao tratamento com TGF- β 1, de anti-proliferativa para invasiva (Shackney and Shankey, 1997; Wilson et al., 2005).

Dessa forma, acredita-se que em linhagens menos agressivas, que apresentam RE positivo (por exemplo: MCF-7), TGF- β 1 estaria mais comprometido com a indução de inibição de crescimento, por meio da modulação de proteínas envolvidas na parada do ciclo celular, tais como p21 e p15. Neste modelo, a presença de RE bloquearia a indução de moléculas importantes do processo de EMT (Rho e E-Caderina) e, conseqüentemente, o evento inicial da cascata metastática. Por sua vez, o tratamento de células RE negativas (por exemplo: MDA-MB-231) com TGF- β 1, levaria à aquisição de uma maior capacidade invasiva e metastática. Dessa forma, a ausência de RE não impediria a indução de EMT por esta citocina. Além disso, a linhagem MDA-MB-231 apresenta, dentre outras alterações, amplificação do oncogene *ras*, levando a regulação negativa de p21 e p15 e, conseqüentemente, ao silenciamento do efeito anti-proliferativo de TGF- β 1 nestas células (Wilson et al., 2005).

Neste trabalho, tem-se como um dos objetivos de estudo a análise do papel de TGF- β 1 na regulação da expressão de moléculas classicamente associadas à capacidade invasiva e metastática celular (MMPs e seus inibidores). Dessa forma, a utilização de uma linhagem em estágios mais avançados da transformação maligna foi considerada o modelo celular mais apropriado. Neste sentido, utilizou-se a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 para os tratamentos com TGF- β 1 recombinante.

5.1.4. O mecanismo de regulação da expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs e RECK) por TGF- β 1

Muitos trabalhos evidenciam que TGF- β 1 desempenha uma importante função no controle da motilidade celular, principalmente através de seu papel como modulador da expressão e atividade de alguns membros da família das MMPs (Hsieh et al., 2010; Kim et al., 2004; Kuo et al., 2009; Safina et al., 2008; Sun et al., 2008; Wiercinska et al., 2010). Kim e colaboradores demonstraram que TGF- β 1 é capaz de induzir invasão em células pré-malignas de mama humana (MCF10A), por meio da indução de MMP-2 e MMP-9 (Kim et al., 2004). Posteriormente, foi verificado que as proteases MMP-2 e MMP-9 também são essenciais para a indução de invasão de células MCF10A, mantidas em culturas celulares em três dimensões (Wiercinska et al., 2010). De modo similar, a alta motilidade apresentada pela linhagem MDA-MB-231, após exposição à TGF- β 1, foi associada à elevação da expressão de MMP-9, induzida pelo tratamento com esta citocina (Safina et al., 2008; Suarez-Cuervo et al., 2004). Por sua vez, nas células MDA-MB-435, foi mostrado que a atividade de MMP-

14 é responsável pelo aumento da capacidade migratória desta linhagem, na presença de TGF- β 1.

O balanço estabelecido entre as atividades das MMPs e seus inibidores é crucial para o controle da degradação da matriz extracelular e, conseqüentemente, para a determinação da capacidade invasiva e metastática de uma célula. Contudo, em nenhum desses estudos prévios foi investigado se TGF- β 1 pode também modular a expressão de inibidores de MMPs. A identificação de reguladores comuns da expressão de MMPs, TIMPs e RECK poderia contribuir para a identificação de importantes fatores envolvidos no controle do processo metastático. Neste contexto, no presente trabalho, foi descrito, pela primeira vez, um mecanismo molecular de modulação da expressão tanto de MMP-2 e MMP-9, quanto de TIMP-2 e RECK, por TGF- β 1.

Através do tratamento da linhagem MDA-MB-231 com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante, foi demonstrado que esta citocina é capaz de induzir o aumento significativo, tanto dos níveis de mRNA, quanto de proteína, de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 (Figuras 15 e 16). Por sua vez, o inibidor de MMPs associado à membrana (RECK), apesar de aumentado, ao nível transcricional, em células expostas ao tratamento com TGF- β 1, apresentou expressão protéica significativamente reduzida, na linhagem MDA-MB-231 submetida às mesmas condições de tratamento (Figura 16). Tal divergência, provavelmente deve-se a mecanismos de regulação pós-transcricionais e pós-traducionais, por meio dos quais TGF- β 1 modularia a expressão de RECK.

TGF- β 1 sinaliza tanto através de mecanismos Smad dependentes, como independentes. Contudo, acredita-se que cada uma dessas vias de sinalização está associada a distintas respostas celulares a TGF- β 1 (Nagaraj and Datta, 2010). Portanto, a troca da função desempenhada por esta citocina ao longo da progressão tumoral, de um supressor de tumor para um fator pró-oncogênico, pode ser causada por alterações em sua sinalização intracelular, através de mudanças nas moléculas responsáveis pela transdução de seu sinal. Sugere-se que a família das Smads está preferencialmente envolvida na regulação de processos antitumorais, como a inibição da proliferação. Por sua vez, as vias de sinalização Smad-independentes estariam implicadas na indução de invasão e metástase tumoral (Giehl et al., 2007; Imamichi et al., 2005; Nagaraj and Datta, 2010).

No presente estudo, foi avaliado o papel de duas bem conhecidas vias de sinalização Smad-independentes (ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK), no mecanismo proposto de regulação coordenada da expressão de MMPs, TIMPs e RECK, por TGF- β 1, utilizando um modelo celular de câncer de mama. Nossos resultados demonstraram que ambas as vias de MAPKs desempenham uma importante função neste mecanismo, contudo, cada uma delas é responsável pela modulação de moléculas específicas (Figura 51).

Figura 51: Esquema do mecanismo molecular proposto para a ação de TGF-β1 como um regulador comum da expressão de MMPs (MMP-2 e MMP-9) e seus inibidores (TIMP-2 e RECK), através das vias de sinalização mediadas por ERK1/2 e p38 MAPK, na linhagem MDA-MB-231.

As linhas pontilhadas representam as regulações sugeridas em ensaios preliminares.

Diferentemente dos resultados descritos anteriormente em células MCF10A, tanto a via sinalização mediada por p38 MAPK, quanto aquela mediada pelas proteínas ERK1/2, mostraram-se essenciais para a transdução do sinal induzido por TGF-β1, sobre o controle da expressão de MMPs (Figuras 19 e 21) (Kim et al., 2004). Nossos resultados sugerem que a proteína p38 MAPK está associada à elevação dos níveis protéicos de MMP-2, enquanto ERK1/2 está envolvido na modulação da expressão de MMP-9 (Figuras 19 e 21). Por sua vez, em relação ao controle da expressão dos inibidores de MMPs por TGF-β1, foi verificado que, embora ambas as vias de sinalização sejam necessárias para a indução da expressão da proteína TIMP-2, apenas a inibição de ERK1/2 foi capaz de bloquear o efeito de TGF-β1 sobre a expressão de RECK (Figuras 20 e 22).

Somada à função de TGF- β 1 no controle da síntese de alguns componentes da matriz extracelular (MEC), nossos dados suportam o importante e complexo papel desta citocina sobre o balanço de degradação da MEC (Verrecchia and Mauviel, 2002). Tal complexidade, evidencia-se na ação dose-dependente de TGF- β 1 sobre os níveis de expressão das proteínas MMP-9 e RECK (Figuras 15 e 16). Além disso, os indícios de interação entre as vias de sinalização de p38 MAPK e ERK1/2, aqui sugeridas e previamente demonstradas em outros modelos celulares, indicam um intrincado mecanismo de transdução do sinal de TGF- β 1 (Figuras 24 e 26) (Estrada et al., 2009).

Portanto, apesar demonstramos a função central de TGF- β 1 na aquisição de características moleculares essenciais para da migração e invasão de células tumorais, este trabalho reforça a dificuldade de aplicação de ferramentas moleculares, baseadas na modulação desta citocina, no tratamento de tumores mamários. O amplo espectro de ações desempenhadas por TGF- β 1 na tumorigênese e arquitetura do microambiente, em associação aos contexto-dependentes, e muitas vezes contraditórios papéis desta citocina ao longo da progressão tumoral, atrapalham sua utilização como alvo molecular na terapia do câncer de mama.

5.2. Expressão de RECK ao longo do desenvolvimento da glândula mamária

Ao longo do desenvolvimento pós-natal, a glândula mamária humana sofre repetidos ciclos de alterações morfológicas e moleculares desencadeadas e orquestradas por variações nos níveis hormonais femininos (Briskin e O'Malley,

2010). Os hormônios estrógeno, progesterona e prolactina estão intimamente associados à regulação das transformações da mama ocorridas, principalmente, durante os processos de puberdade, gravidez, lactação e involução. Nestes processos, e de forma menos intensa ao longo de cada ciclo estral, tem-se um intenso remodelamento da matriz extracelular e modificações nas taxas proliferativas e de morte celular (Muschler e Streuli, 2010; Schedin e Keely, 2011).

Embora seja um fenômeno fisiológico normal, muitos dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento mamário estão também envolvidos na transformação maligna (Foubert et al., 2010; Muschler and Streuli, 2010; Polyak and Kalluri, 2010; Schedin and Keely, 2011). Entretanto, sabe-se que apesar de muitas moléculas serem comuns a ambos os processos, em situações patológicas, o rígido e conservado controle da expressão e atividade dessas moléculas é perdido, de modo a subverter, potencializar ou inibir sua funcionalidade.

A identificação de proteínas envolvidas no desenvolvimento da glândula mamária poderia contribuir para a descoberta de importantes moléculas relacionadas ao controle do processo tumorigênico. No presente trabalho, foram obtidos resultados preliminares sobre o perfil de expressão e localização celular de RECK, ao longo dos diferentes estágios de diferenciação pós-natal da mama (item 4.2 dos Resultados). Considerou-se essencial esta investigação, pois, até o presente momento, muito pouco é sabido sobre o papel deste inibidor de MMPs em processos fisiológicos normais.

Através de ensaios de diferenciação da glândula mamária *in vitro*, demonstrou-se que a expressão de mRNA e proteína de RECK é inibida pelo

tratamento hormonal (prolactina e hidrocortisona), em células epiteliais de mama murina não transformadas (Figura 31). A análise preliminar da expressão de RECK em amostras teciduais de mama de camundongos fêmeas virgens, grávidas, lactantes e pós-amamentação, sugere que RECK é induzido durante a gestação. Por sua vez, estes níveis elevados de expressão de RECK não são sustentados durante os estágios de lactação e involução (Figura 32).

O importante papel do remodelamento da matriz celular, bem como das alterações no contato célula-célula e célula-matriz, ao longo dos vários estágios do desenvolvimento da glândula mamária, já estão bem estabelecidos (Muschler and Streuli, 2010; Radisky and Radisky, 2010; Schedin and Keely, 2011). Entretanto, a expressão e atividade das MMPs e seus inibidores, durante a puberdade, gravidez, lactação e involução, ainda não estão elucidados.

Alta expressão de MMP-9 já foi associada à produção de leite por células normais de epitélio mamário de rato (Shea-Eaton et al., 2001). Portanto, sugere-se a necessidade de altas taxas de remodelamento da matriz extracelular, por meio da elevada atividade de MMPs e baixa expressão de seus inibidores, durante a lactação. Corroborando esta idéia, verificou-se uma correlação inversa entre a expressão de RECK (mRNA e proteína) e os níveis transcricionais de β -caseína. No mesmo sentido, nossos resultados, indicam que RECK é pouco expresso durante a involução do tecido mamário, tendo sido descrito que, neste estágio do desenvolvimento mamário, elevados níveis de expressão de MMPs foram detectados (Alexander et al., 2001; Schedin et al., 2000).

Entretanto, em contradição aos dados obtidos nos ensaios de diferenciação da glândula mamária (Figura 31) e nas análises da expressão de RECK em amostras de mama murina em diferentes estágios do desenvolvimento (Figura 32), foi observado, através de ensaios de imunofluorescência, que a proteína RECK é prioritariamente mais expressa pelas células epiteliais, presentes nos lóbulos mamários produtores de leite, de camundongos fêmeas lactantes (Figura 33). Sugere-se que tais discordâncias devam-se à utilização de modelos celulares e animais distintos. Os ensaios de qRT-PCR e Western-blot foram realizados para quantificação da expressão de RECK em amostras de mama de camundongos fêmeas CD-1. Por sua vez, nos ensaios de imunofluorescência, foi avaliada a localização e expressão da proteína RECK na glândula mamária de camundongos fêmeas, do tipo Balb/c, virgens e lactantes. Dessa maneira, faz-se necessária uma análise mais completa e detalhada para o esclarecimento do perfil de expressão de RECK durante a lactação.

5.3. Expressão de RECK como indicador de menor tempo de sobrevida de pacientes com câncer de mama

Os resultados obtidos nos ensaios de *Tissue Microarray* (item 4.3 dos Resultados) demonstram que a expressão RECK é um indicador de pior prognóstico. Entretanto, muitos são os trabalhos que correlacionam altos níveis de expressão de RECK a maiores tempos de sobrevida, em pacientes diagnosticadas com diferentes tipos de tumores (Namwat et al., 2011; Rabien et al., 2007; Song et al., 2006; Takemoto et al., 2007; Takeuchi et al., 2004; Xu et al., 2010). Tais relações já foram demonstradas em: osteosarcoma, tumores pancreáticos, hepatocarcinoma, câncer

gástrico, de próstata, coloretal e de pulmão (Clark et al., 2007; Noda and Takahashi, 2007). No entanto, muito pouco foi descrito sobre o perfil de expressão RECK em tumores de mama.

A inibição de RECK ao longo da transformação maligna tem sido relacionada a diferentes mecanismos moleculares. Processos epigenéticos, como acetilação de histonas e metilação do DNA, são mecanismo importantes, sabidamente envolvidos na repressão da expressão de RECK durante a progressão tumoral (Jeon et al., 2010; Kato et al., 2008; Long et al., 2008; Pesta et al., 2009; Sasahara et al., 2002). Além disso, mais recentemente, foram demonstrados mecanismos de inibição da expressão de RECK por microRNAs, mais especificamente o microRNA-21 (Gabriely et al., 2008; Liu et al., 2010).

Apenas dois trabalhos, utilizando amostras teciduais de tumores mamários humanos, para análise da expressão de RECK, foram publicados até o momento. Corroborando os dados obtidos em outros tipos de neoplasias, Span e colaboradores associaram altos níveis de expressão gênica de RECK ao melhor prognóstico de pacientes com câncer de mama (Span et al., 2003). Por sua vez, resultados previamente gerados pelo nosso laboratório, demonstraram que níveis elevados de mRNA de RECK correlacionam-se positivamente com maior expressão de MMPs e TIMPs (Figueira et al., 2009). No primeiro trabalho, a expressão de RECK foi avaliada em apenas 10 amostras de tecido tumoral e tecido normal adjacente (Span et al., 2003). Já os dados gerados por Figueira e seus colaboradores foram obtidos à partir da análise de 72 amostras teciduais de tumores primários de mama e 30 amostras da borda não tumoral adjacente (Figueira et al., 2009). Além de discordantes, os poucos

dados disponíveis sobre RECK em modelo de mamário humano, limitaram-se apenas à análise dos níveis de expressão transcricionais deste gene.

No presente trabalho, foi realizada a análise em larga escala, através da metodologia de TMA, do perfil de expressão protéica de RECK em 1040 amostras de tumores de mama. Dessa forma, foi demonstrado, pela primeira vez, que pacientes portadoras de tumores mamários, positivos para a expressão da proteína RECK, apresentam menor tempo de sobrevida global e livre de doença em 10 anos (Figura 36). Logo, estes resultados opõem-se àqueles verificados em tumores derivados de diferentes tecidos, nos quais RECK é diminuído ao longo da progressão tumoral, em forma inversa ao aumento da expressão e atividade das MMPs (Noda and Takahashi, 2007).

Além disso, nossos dados demonstraram que RECK é indicador de menor tempo de sobrevida em 10 anos, principalmente para pacientes diagnosticadas com tumores de mama menos agressivos (baixo grau TNM, positivos para expressão de marcadores luminais, negativos para a expressão de marcadores basais, negativos para o receptor do fator de crescimento EGF) (Figuras de 37 a 43). Por sua vez, o poder prognóstico de RECK é perdido em tumores de mama detectados em estágios mais avançados da doença. Dessa forma, a separação da pacientes em função da expressão diferencial de RECK, não levou a obtenção de grupos com tempos de sobrevida global e livre de doença, significativamente distintos para tumores de alto grau TNM, expressão negativa para os marcadores luminais e expressão positiva para os marcadores de células basais e para EGFR (Figuras de 37 a 43).

As proteínas CK5,6 e CK14 são clássicos marcadores do fenótipo celular basal, enquanto a expressão das CK8 e CK18 relaciona-se às características celulares luminais (Bocker et al., 2009). Dentre os vários eventos associados à aquisição da capacidade invasiva e metastática por células tumorais, tem-se o processo de transição epitélio mesênquima (EMT). Por meio deste processo, as células epiteliais presentes na massa de tumor primário passam por uma série de alterações moleculares e morfológicas, adquirem fenótipo mesenquimal e, conseqüentemente, uma maior motilidade celular (Bacac e Stamenkovic, 2008). Logo, a perda das características luminais, e a transição para um comportamento mais próximo ao fenótipo basal, estariam relacionadas à progressão da doença. Neste sentido, alguns trabalhos demonstram que tumores com expressão positiva para marcadores basais e negativa para luminais, apresentam pior prognóstico (Bhalla et al., 2010; Ciocca et al., 2006; Sartorius et al., 2005).

O receptor para o fator de crescimento EGF (EGFR) está relacionado a mecanismos de pró-oncogênicos, em vários tipos de neoplasia, incluindo tumores mamários humanos, através do controle da apoptose, proliferação celular, invasão e metástase (Lurje and Lenz, 2009). Neste contexto, elevada expressão de EGFR apresenta-se como um indicador de pior prognóstico e menor resposta à terapia, para pacientes diagnosticadas com câncer de mama (Massarweh et al., 2008; Modjtahedi and Essapen, 2009).

O fator de transcrição p53 é um dos mais estudados, conhecidos e bem estabelecidos supressores de tumor (Ozaki and Nakagawara, 2011). Esta proteína tem papel central na resposta ao dano no DNA, por ser capaz de transativar uma

grande variedade de genes implicados na indução de parada de ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (Ozaki and Nakagawara, 2011). Mutações no gene TP53 são encontradas em aproximadamente 50% dos cânceres humanos, principalmente (mais de 90%) em seu domínio de ligação ao DNA (Bertheau et al., 2008). Entre os tumores de mama tem-se uma frequência de 20 a 35% de mutações em TP53.

A associação entre os níveis de expressão de p53 e a malignidade de tumores de mama mostrou-se muito complexa e contexto-dependente. Sabe-se que a expressão positiva da proteína p53 pode tanto indicar melhor, quanto pior prognóstico, para pacientes com tumores mamários, dependendo do subtipo tumoral. Dessa maneira, em pacientes com tumores positivos para Her-2, a expressão negativa de p53 é um indicativo de pior curso clínico da doença (Al-Azawi et al., 2010). De modo contrário, em tumores triplo-negativos, a expressão de p53 associa-se a pior prognóstico (Biganzoli et al., 2011).

Em conjunto, os resultados gerados nesta parte do trabalho demonstraram, pela primeira vez, que a expressão da proteína RECK é um indicador de menor tempo de sobrevida de pacientes com tumores mamários. Portanto, além da investigação de ações independentes de sua clássica ação como inibidor de MMPs, sugere-se a verificação da presença de mutações em sua sequência, que expliquem este contraditório perfil de expressão em modelo de câncer de mama.

5.4. Análise funcional de RECK em câncer mama: modulação de MMP-9 e inibição de invasão celular

Em nosso trabalho anterior, foi demonstrado que, diferentemente do observado em outros tipos celulares, maiores níveis de expressão gênica de RECK são detectados em células de carcinoma mamário humano mais agressivas, em comparação aos dados obtidos em linhagens tumorais pouco invasivas e metastáticas (Figueira et al., 2009). Os resultados aqui apresentados confirmaram este padrão diferenciado de expressão de mRNA de RECK, em modelo de câncer de mama (Figura 12). Além disso, foi confirmado que o perfil de expressão protéica de RECK acompanha a mesma tendência: alta expressão em células de alto caráter invasivo e metastático (Figura 44).

Somado aos dados de expressão da proteína RECK em amostras teciduais de câncer de mama (Figuras de 36 a 43), obtidos nos ensaios de TMA, os resultados observados em modelos celulares, indicam que, em câncer de mama, RECK está associado a estádios mais avançados da doença, fenótipo agressivo, pior curso clínico e menor tempo de sobrevida.

A única função da proteína RECK, descrita até o presente momento, é como inibidor de invasão e metástase, por meio da redução da atividade, secreção e expressão de MMPs (Liu et al., 2003; Rhee and Coussens, 2002; Silveira Correa et al., 2010; Takagi et al., 2009; Takahashi et al., 1998). Contudo, a detecção de elevados níveis de expressão de uma molécula classicamente envolvida em processos anti-invasivos, em linhagens celulares e amostras tumorais altamente agressivas, é aparentemente incoerente. Neste contexto, nos perguntamos se RECK

desempenharia funções celulares distintas em câncer de mama, independentes de sua ação sobre a motilidade celular, através de mecanismos moleculares associados à inibição de MMPs.

Para o esclarecimento da função exercida por RECK em uma linhagem de mama altamente invasiva, foi realizada a análise funcional desta proteína, utilizando-se as células MDA-MB-231 como modelo de estudo. Os elevados níveis de expressão da proteína RECK, detectados nesta linhagem, foram inibidos, por meio da metodologia de RNA de interferência (Figuras 46 e 47).

Ensaio de invasão celular *in vitro* indicam que RECK também atua como um inibidor de invasão, através da modulação da atividade de MMPs, em células de câncer de mama (Figura 48). Verificou-se que células MDA-MB-231 RECK deficientes apresentam potencial invasivo, significativamente maior, em relação às células controle. Além disso, a inibição da atividade de MMPs, através da utilização de inibidor farmacológico, foi capaz de reverter este efeito (Figura 48). Além disso, os resultados obtidos demonstram que RECK também é capaz de modular negativamente a expressão de MMP-9, em células MDA-MB-231.

Estes resultados sugerem que, apesar do perfil de expressão diferenciado de RECK em câncer de mama, esta proteína desempenha, de modo geral, as mesmas funções verificadas em outros tipos de tecidos. Portanto, em tumores mamário humanos, os elevados níveis de expressão de RECK, detectados tanto em amostras teciduais derivadas de tumores mais agressivos, quanto em linhagens celulares com alta capacidade invasiva e metastática, estariam relacionadas a um mecanismo de resposta celular ao aumento da atividade de proteinases. Dessa maneira, sugere-se

que, na tentativa do restabelecimento do balanço proteases/inibidores, as células de mama responderiam a progressão tumoral induzindo, dentre outros, a expressão de RECK.

Contudo, como perspectiva desta parte do trabalho, sugere-se a confirmação dos resultados gerados *in vitro* em modelos animais, através da realização de ensaios de metástase experimental e tumorigênese. Além disso, considera-se interessante a avaliação da função de RECK em outros processos celulares ainda não relacionados à ação desta proteína, como por exemplo, a regulação de morte celular. A descoberta de novos alvos moleculares de RECK, através da comparação dos perfis de expressão gênica das células RECK deficientes geradas e das células controle, poderia contribuir para a descoberta de novas funções desta molécula.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitiram concluir que:

- A progressão do caráter invasivo e metastático, de linhagens celulares de carcinoma mamário humano, correlaciona-se positivamente não apenas com os níveis de expressão gênica de MMPs (MMP-2 e MMP-14) e seus inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK), mas também com a indução de mRNA das isoformas (TGF- β 1 e TGF- β 2) e receptores (T β RI e T β RII) de TGF- β .
- TGF- β 1 é um modulador comum da expressão de MMPs (MMP-2 e MMP-9) e inibidores de MMPs (TIMP-2 e RECK) em modelo celular de carcinoma mamário humano. A regulação da expressão gênica e protéica dessas moléculas, pelo tratamento da linhagem MDA-MB-231 com diferentes concentrações de TGF- β 1 recombinante, foi dose-dependente. Níveis significativamente mais elevados de mRNA de MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-2 e RECK e protéicos de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, foram induzidos por TGF- β 1. Entretanto, a expressão da proteína RECK foi inibida por este tratamento.
- As vias de sinalização mediadas pelas proteínas ERK $\frac{1}{2}$ e p38 MAPK são importantes para a transdução de sinal de TGF- β 1, no mecanismo de regulação coordenada da expressão de MMPs, TIMPs e RECK, em modelo celular de câncer de mama. Porém, cada uma destas MAPKs é responsável pela modulação de moléculas específicas. Dessa maneira, demonstrou-se que a ativação de ERK $\frac{1}{2}$ regula a

expressão das proteínas MMP-9, TIMP-2 e RECK, enquanto p38 MAPK controla os níveis protéicos de MMP-2 e TIMP-2.

- TGF- β 1 é capaz de induzir o potencial migratório e invasivo da linhagem MDA-MB-231. Este efeito deve-se, provavelmente, ao papel exercido por esta citocina sobre o controle do balanço MMPs/inibidores, através da atividade de ERK $\frac{1}{2}$ e p38MAPK.
- A expressão de mRNA e proteína de RECK mostrou-se mais elevada em amostras de mama derivadas de animais prenhas. Por sua vez, durante a lactação, os resultados preliminares obtidos até o presente momento são contraditórios. Enquanto a expressão de RECK foi reprimida em ensaios de diferenciação da glândula mamária, verificou-se elevada expressão da proteína RECK em células epiteliais, presentes nos lóbulos mamários produtores de leite, de camundongos fêmeas lactantes.
- RECK é um indicador de pior prognóstico para pacientes com câncer de mama, dado que menores tempos de sobrevida global e livre de doença foram associados à maior expressão desta proteína no momento do diagnóstico.
- A expressão positiva para a proteína RECK é um indicador de menor tempo de sobrevida de pacientes diagnosticadas com tumores de baixo grau TNM, positivos para o supressor de tumor p53 e com menor expressão do proto-oncogene EGFR.

- A expressão da proteína RECK é um indicador de pior prognóstico para pacientes diagnosticadas com tumores de fenótipo luminal (CK8 e CK18 positivos e CK5,6 e CK14 negativos).
- Apesar de altamente expresso em linhagens celulares de mama de alto potencial invasivo e metastático, RECK continua a atuar como um inibidor de invasão celular e da expressão de MMP-9, neste modelo.
- A proteína RECK não exerce efeito sobre o crescimento celular na linhagem de carcinoma mamário humano MDA-MB-231.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram, pela primeira vez, que a expressão gênica de RECK é modulada por TGF- β 1 em células de carcinoma mamário humano. Em oposição ao efeito desta citocina sobre a expressão das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, foi verificado que os níveis protéicos de RECK são regulados negativamente por TGF- β 1, indicando sua ação diferenciada no processo de progressão tumoral. Portanto, estes dados sugerem que a inibição da proteína RECK é essencial para o desempenho da ação pró-tumoral de TGF- β 1, através da indução da capacidade migratória e invasiva de células tumorais de mama.

Devido à ausência de relatos sobre sua função no tecido mamário, a análise funcional de RECK, realizada no presente trabalho, contribuiu para o esclarecimento de seu papel neste modelo. A constatação do potencial envolvimento de RECK no processo de diferenciação da glândula mamária reforçou nossa proposta de seu papel na tumorigênese da mama, dada a proximidade dos mecanismos moleculares implicados nestes dois processos. A relação inédita entre os altos níveis de expressão da proteína RECK e menor tempo de sobrevida das pacientes com câncer de mama, proposta neste estudo, demonstrou que, diferentemente de outros tecidos, a expressão de RECK é induzida ao longo da progressão tumoral, sugerindo uma regulação distinta de sua expressão gênica, neste modelo. Estes resultados indicam que a expressão de RECK apresenta um importante poder prognóstico, e que em conjunto com outros marcadores moleculares tumorais clássicos e dados clínico-patológicos das pacientes, pode vir a ser utilizado como uma importante ferramenta

na determinação das chances de sobrevida de mulheres diagnosticadas com tumores mamários.

Neste trabalho, também foi confirmada a ação inibitória de RECK sobre a expressão e atividade de MMPs. Dessa forma, apesar de sozinho não ser capaz de restabelecer a homeostase da proteólise da MEC, altos níveis de expressão de RECK, detectados em estágios mais avançados da doença, poderiam ainda frear, mesmo que de maneira não muito eficiente, a capacidade invasiva de células tumorais. Assim, a inibição de RECK numa linhagem de câncer de mama altamente invasiva, como a linhagem MDA-MB-231, levou à geração de células com potenciais invasivos ainda mais elevados.

Portanto, o presente trabalho nos permitiu concluir que RECK está intimamente relacionado a processos de progressão do câncer de mama, pois é: alvo de importantes moléculas associadas ao desenvolvimento de tumores (TGF- β 1 e MAPKs), inibidor de invasão celular e MMPs, além de um indicador de pior prognóstico. Como perspectiva e novas frentes de trabalho abertas por este projeto têm-se: a análise do papel das vias Smad-dependentes na regulação da expressão de RECK, bem como de MMPs e TIMPs; a superexpressão e inibição RECK em células epiteliais murinas para avaliação de seu papel no desenvolvimento da mama, através de ensaios *in vitro* de diferenciação da glândula mamária e *branching morphogenesis*; a realização de ensaios de metástase experimental e tumorigênese com as células de carcinoma mamário humano RECK deficientes geradas e a investigação de novas ações de RECK, através da descoberta de seus potenciais alvos moleculares utilizando-se plataformas de microarranjos de DNA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 351, 1451-1467.
- (2001). NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. *South Med J* 94, 569-573.
- Aapro, M. S. (2001). Adjuvant therapy of primary breast cancer: a review of key findings from the 7th international conference, St. Gallen, February 2001. *Oncologist* 6, 376-385.
- ACS (2010). Cancer facts & figures 2010. American Cancer Society, 1-68
- Akhurst, R. J., and Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11, S44-51.
- Al-azawi, D., Leong, S., Wong, L., Kay, E., Hill, A. D., and Young, L. HER-2 positive and p53 negative breast cancers are associated with poor prognosis. *Cancer investigation* 29, 365-369.
- Alexander, C. M., Selvarajan, S., Mudgett, J., and Werb, Z. (2001). Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *The Journal of cell biology* 152, 693-703.
- Anzano, M. A., Roberts, A. B., Meyers, C. A., Komoriya, A., Lamb, L. C., Smith, J. M., and Sporn, M. B. (1982). Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer research* 42, 4776-4778.
- Anzano, M. A., Roberts, A. B., Smith, J. M., Sporn, M. B., and De Larco, J. E. (1983). Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 6264-6268.
- Bacac, M., and Stamenkovic, I. (2008). Metastatic cancer cell. *Annual review of pathology* 3, 221-247.
- Bachmeier, B. E., Albini, A., Vene, R., Benelli, R., Noonan, D., Weigert, C., Weiler, C., Lichtinghagen, R., Jochum, M., and Nerlich, A. G. (2005). Cell density-dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in differently tumorigenic breast cancer cell lines. *Exp Cell Res* 305, 83-98.
- Bertheau, P., Espie, M., Turpin, E., Lehmann, J., Plassa, L. F., Varna, M., Janin, A., and de The, H. (2008). TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology* 75, 132-139.
- Bhalla, A., Manjari, M., Kahlon, S. K., Kumar, P., and Kalra, N. Cytokeratin 5/6 expression in benign and malignant breast lesions. *Indian journal of pathology & microbiology* 53, 676-680.
- Bierie, B., and Moses, H. L. (2009). Gain or loss of TGFbeta signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis. *Cell Cycle* 8, 3319-3327.
- Biganzoli, E., Coradini, D., Ambrogi, F., Garibaldi, J. M., Lisboa, P., Soria, D., Green, A. R., Pedriali, M., Piantelli, M., Querzoli, P., *et al.* p53 status identifies two subgroups of triple-negative breast cancers with distinct biological features. *Japanese journal of clinical oncology* 41, 172-179.
- Bocker, W., Hungermann, D., and Decker, T. (2009). [Anatomy of the breast]. *Der Pathologe* 30, 6-12.
- Bourboulia, D., and Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in cancer biology* 20, 161-168.
- Brand, F. X., Ravel, N., Gauchez, A. S., Pasquier, D., Payan, R., Fagret, D., and Mousseau, M. (2006). Prospect for anti-HER2 receptor therapy in breast cancer. *Anticancer research* 26, 463-470.

- Brew, K., Dinakarpanian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-283.
- Yoder, B.J., Wilkinson, E. J., Massoll, N. A. (2007). Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *The Breast Journal* 13, 172-179.
- Briskin, C., and O'Malley, B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a003178.
- Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14, 911-915.
- Caterina, N. C., Windsor, L. J., Yermovsky, A. E., Bodden, M. K., Taylor, K. B., Birkedal-Hansen, H., and Engler, J. A. (1997). Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Biol Chem* 272, 32141-32149.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Molecular and cellular biochemistry* 253, 269-285.
- Ciocca, V., Bombonati, A., Gatalica, Z., Di Pasquale, M., Milos, A., Ruiz-Orrico, A., Dreher, D., Folch, N., Monzon, F., Santeusano, G., *et al.* (2006). Cytokeratin profiles of male breast cancers. *Histopathology* 49, 365-370.
- Clark, I. M., Swingler, T. E., Sampieri, C. L., and Edwards, D. R. (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 1362-1378.
- Clark, J. C., Thomas, D. M., Choong, P. F., and Dass, C. R. (2007). RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer metastasis reviews* 26, 675-683.
- Cui, Y., Page, D. L., Lane, D. S., and Rohan, T. E. (2009). Menstrual and reproductive history, postmenopausal hormone use, and risk of benign proliferative epithelial disorders of the breast: a cohort study. *Breast cancer research and treatment* 114, 113-120.
- de Larco, J. E., and Todaro, G. J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4001-4005.
- de Waard, F., and Thijssen, J. H. (2005). Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special reference to nutritional status and first pregnancy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 97, 451-458.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.
- De Santes, K., Slamon, D., Anderson, S. K., Shepard, M., Fendly, B., Maneval, D., Press, O. (1992) Radiolabeled antibody targeting of the HER-2/neu oncoprotein. *Cancer Research* 52:1916-23.
- Desprez, P. Y., Roskelley, C., Campisi, J., Bissell, M. J. (1993). Isolation of functional cell lines from a mouse mammary epithelial cell strain: the importance of basement membrane and cell-cell interaction. *Molecular and Cellular Differentiation* 1, 99-110.
- Desruisseau, S., Palmari, J., Giusti, C., Romain, S., Martin, P. M., and Berthois, Y. (2006). Determination of TGFbeta1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival. *British journal of cancer* 94, 239-246.
- Dimri, G., Band, H., Band, V. (2005). Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research* 7:171-179.

- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews* 2, 161-174.
- Eisenberg, I., Hochner, H., Sadeh, M., Argov, Z., and Mitrani-Rosenbaum, S. (2002). Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. *Cytogenetic and genome research* 97, 58-61.
- Engel, L. W., Young, N. A., Tralka, T. S., Lippman, M. E., O'Brien, S. J., and Joyce, M. J. (1978). Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* 38, 3352-3364.
- Estrada, Y., Dong, J., and Ossowski, L. (2009). Positive crosstalk between ERK and p38 in melanoma stimulates migration and in vivo proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 66-76.
- Figueira, R. C. (2006). Expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs e RECK) em modelo de progressão tumoral de câncer de mama e sua correlação com dados clínico-patológicos. Departamento de Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- Figueira, R. C., Gomes, L. R., Neto, J. S., Silva, F. C., Silva, I. D., and Sogayar, M. C. (2009). Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. *BMC Cancer* 9, 20.
- Figuerola, J. D., Flanders, K. C., Garcia-Closas, M., Anderson, W. F., Yang, X. R., Matsuno, R. K., Duggan, M. A., Pfeiffer, R. M., Ooshima, A., Cornelison, R., *et al.* Expression of TGF-beta signaling factors in invasive breast cancers: relationships with age at diagnosis and tumor characteristics. *Breast cancer research and treatment* 121, 727-735.
- Filho, A. O. A. R., Castro, T. W. N., Rêgo, M. A. V., Alves, F. O., Almeida, L., C., Sousa, M. V., Vieira, M. G. S., Schaer-Barbosa, H. (2002). Fatores preditivos de recidiva do carcinoma mamário axila-negativo
- Foubert, E., De Craene, B., and Berx, G. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 12, 206.
- Furumoto, K., Arii, S., Mori, A., Furuyama, H., Gorris Rivas, M. J., Nakao, T., Isobe, N., Murata, T., Takahashi, C., Noda, M., and Imamura, M. (2001). 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 (Baltimore, Md)* 33, 189-195.
- Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C. C., Burchard, J., Linsley, P. S., and Krichevsky, A. M. (2008). MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Molecular and cellular biology* 28, 5369-5380.
- Ganapathy, V., Ge, R., Grazioli, A., Xie, W., Banach-Petrosky, W., Kang, Y., Lonning, S., McPherson, J., Yingling, J. M., Biswas, S., *et al.* (2010). Targeting the Transforming Growth Factor-beta pathway inhibits human basal-like breast cancer metastasis. *Mol Cancer* 9, 122.
- Giehl, K., Imamichi, Y., and Menke, A. (2007). Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. *Cells, tissues, organs* 185, 123-130.
- Gomes, L. R., Terra, L. F., Sogayar, M. C., and Labriola, L. (2011). Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Curr Pharm Biotechnol*.
- Gross, J., and Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1014-1022.
- Hackett, A. J., Smith, H. S., Springer, E. L., Owens, R. B., Nelson-Rees, W. A., Riggs, J. L., and Gardner, M. B. (1977). Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J Natl Cancer Inst* 58, 1795-1806.

- Hall, M. C., Young, D. A., Waters, J. G., Rowan, A. D., Chantry, A., Edwards, D. R., and Clark, I. M. (2003). The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *The Journal of biological chemistry* 278, 10304-10313.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.
- Herold, C., Reck, T., Fischler, P., Ott, R., Radespiel-Troeger, M., Ganslmayer, M., Hohenberger, W., Hahn, E. G., and Schuppan, D. (2002). Prognosis of a large cohort of patients with hepatocellular carcinoma in a single European centre. *Liver* 22, 23-28.
- Hoshino, Y., Katsuno, Y., Ehata, S., and Miyazono, K. (2011). Autocrine TGF-beta protects breast cancer cells from apoptosis through reduction of BH3-only protein, Bim. *J Biochem* 149, 55-65.
- Hsieh, H. L., Wang, H. H., Wu, W. B., Chu, P. J., and Yang, C. M. (2010). Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF-kappaB pathways. *J Neuroinflammation* 7, 88.
- Hyttiainen, M., Penttinen, C., and Keski-Oja, J. (2004). Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 41, 233-264.
- Imamichi, Y., Waidmann, O., Hein, R., Eleftheriou, P., Giehl, K., and Menke, A. (2005). TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biological chemistry* 386, 225-236.
- Inca (2004) Controle de câncer de mama: documento de consenso, Instituto Nacional do Câncer, 1-39
- Inca (2010) Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil, Instituto Nacional do Câncer, 1-100
- Itoh, Y., and Nagase, H. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem* 38, 21-36.
- Ivanovic, V., Todorovic-Rakovic, N., Demajo, M., Neskovic-Konstantinovic, Z., Subota, V., Ivanisevic-Milovanovic, O., and Nikolic-Vukosavljevic, D. (2003). Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. *Eur J Cancer* 39, 454-461.
- Jakowlew, S. B. (2006). Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25, 435-457.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61, 69-90.
- Jeon, H. W., Lee, K. J., Lee, S. H., Kim, W. H., and Lee, Y. M. Attenuated expression and function of the RECK tumor suppressor under hypoxic conditions is mediated by the MAPK signaling pathways. *Archives of pharmacal research* 34, 137-145.
- Jezierska, A., and Motyl, T. (2009). Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit* 15, RA32-40.
- Junior, J. M., Junior, A. B., Mazzocco, C. , Laginha, F., Fernandes, C. E., Marques, J. A. (2002) Câncer de mama associado à gravidez:um estudo caso/controle. *RBGO* 24, 585-591.
- Kanazawa, A., Oshima, T., Yoshihara, K., Tamura, S., Yamada, T., Inagaki, D., Sato, T., Yamamoto, N., Shiozawa, M., Morinaga, S., *et al.* Relation of MT1-MMP gene expression to outcomes in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology* 102, 571-575.
- Kato, K., Long, N. K., Makita, H., Toida, M., Yamashita, T., Hatakeyama, D., Hara, A., Mori, H., and Shibata, T. (2008). Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *British journal of cancer* 99, 647-654.

- Kawashima, S., Imamura, Y., Chandana, E. P., Noda, T., Takahashi, R., Adachi, E., Takahashi, C., and Noda, M. (2008). Localization of the membrane-anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junctions. *Journal of neurochemistry* 104, 376-385.
- Keely, P. J. Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 16, 205-219.
- Kim, E. S., Kim, M. S., and Moon, A. (2004). TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *International journal of oncology* 25, 1375-1382.
- Kim, N. Y., Lee, J. E., Chang, H. J., Lim, C. S., Nam, D. H., Min, B. H., Park, G. H., and Oh, J. S. (2008). Gamma-irradiation enhances RECK protein levels in Panc-1 pancreatic cancer cells. *Mol Cells* 25, 105-111.
- Klein, T., and Bischoff, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino acids* 41, 271-290.
- Kuo, Y. C., Su, C. H., Liu, C. Y., Chen, T. H., Chen, C. P., and Wang, H. S. (2009). Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *International journal of cancer* 124, 2568-2576.
- Kuvaja, P., Talvensaaari-Mattila, A., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2008). High preoperative plasma TIMP-1 is prognostic for early relapse in primary breast carcinoma. *International journal of cancer* 123, 846-851.
- Kuvaja, P., Wurtz, S. O., Talvensaaari-Mattila, A., Brunner, N., Paakko, P., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2007). High serum TIMP-1 correlates with poor prognosis in breast carcinoma - a validation study. *Cancer Biomark* 3, 293-300.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B., and Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 187-198.
- lanigan, F., O'Connor, D., Martin, F., and Gallagher, W. M. (2007). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 64, 3159-3184.
- Laverty, H. G., Wakefield, L. M., Occleston, N. L., O'Kane, S., and Ferguson, M. W. (2009). TGF-beta3 and cancer: a review. *Cytokine & growth factor reviews* 20, 305-317.
- Le Doussal, V., Tubiana-Hulin, M., Friedman, S., Hacene, K., Spyrtatos, F., Brunet, M. (1989) Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 64:1914-21
- Lee, H., Lim, C., Lee, J., Kim, N., Bang, S., Min, B., Park, G., Noda, M., Stetler-Stevenson, W. G., and Oh, J. (2008). TGF-beta signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. *Journal of cellular biochemistry* 104, 1065-1074.
- Leivonen, S. K., Chantry, A., Hakkinen, L., Han, J., and Kahari, V. M. (2002). Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 277, 46338-46346.
- Liss, M., Sreedhar, N., Keshgegian, A., Sauter, G., Chernick, M. R., Prendergast, G. C., and Wallon, U. M. (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 is elevated in early-stage breast cancers with accelerated progression and poor clinical course. *The American journal of pathology* 175, 940-946.
- Liu, C., Yu, J., Yu, S., Lavker, R. M., Cai, L., Liu, W., Yang, K., He, X., and Chen, S. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 53, 98-107.

- Liu, L. T., Chang, H. C., Chiang, L. C., and Hung, W. C. (2003). Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer research* 63, 3069-3072.
- Long, N. K., Kato, K., Yamashita, T., Makita, H., Toida, M., Hatakeyama, D., Hara, A., Mori, H., and Shibata, T. (2008). Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology* 44, 1052-1058.
- Lurje, G., and Lenz, H. J. (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 77, 400-410.
- MacFarlane, R. J., and Gelmon, K. A. Lapatinib for breast cancer: a review of the current literature. *Expert opinion on drug safety* 10, 109-121.
- Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 169-178.
- Massarweh, S., Osborne, C. K., Creighton, C. J., Qin, L., Tsimelzon, A., Huang, S., Weiss, H., Rimawi, M., and Schiff, R. (2008). Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer research* 68, 826-833.
- Masui, T., Doi, R., Koshiba, T., Fujimoto, K., Tsuji, S., Nakajima, S., Koizumi, M., Toyoda, E., Tulachan, S., Ito, D., *et al.* (2003). RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin Cancer Res* 9, 1779-1784.
- Meng, N., Li, Y., Zhang, H., and Sun, X. F. (2008). RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. *Histology and histopathology* 23, 1003-1010.
- Meulmeester, E., and Ten Dijke, P. (2011). The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *The Journal of pathology* 223, 205-218.
- Miki, T., Shamma, A., Kitajima, S., Takegami, Y., Noda, M., Nakashima, Y., Watanabe, K., and Takahashi, C. The ss1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 8, 665-676.
- Milanezi, F., Carvalho, S., and Schmitt, F. C. (2008). EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert review of molecular diagnostics* 8, 417-434.
- Mimori, K., Ueo, H., Shirasaka, C., and Mori, M. (2001). Clinical significance of MT1-MMP mRNA expression in breast cancer. *Oncology reports* 8, 401-403.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., Miyazono, K. (2002) Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7:1191-1204.
- Modjtahedi, H., and Essapen, S. (2009). Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities. *Anti-cancer drugs* 20, 851-855.
- Mook, O. R., Frederiks, W. M., and Van Noorden, C. J. (2004). The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et biophysica acta* 1705, 69-89.
- Muschler, J., and Streuli, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a003202.
- Nagaraj, N. S., and Datta, P. K. (2010). Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert opinion on investigational drugs* 19, 77-91.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 69, 562-573.
- Nakopoulou, L., Giannopoulou, I., Stefanaki, K., Panayotopoulou, E., Tsirmpa, I., Alexandrou, P., Mavrommatis, J., Katsarou, S., and Davaris, P. (2002). Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *The Journal of pathology* 197, 307-313.

- Namwat, N., Puetkasichonpasutha, J., Loilome, W., Yongvanit, P., Techasen, A., Puapairoj, A., Sripa, B., Tassaneeyakul, W., Khuntikeo, N., and Wongkham, S. Downregulation of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) is associated with enhanced expression of matrix metalloproteinases and cholangiocarcinoma metastases. *Journal of gastroenterology* 46, 664-675.
- Noda, M., Kitayama, H., Matsuzaki, T., Sugimoto, Y., Okayama, H., Bassin, R. H., and Ikawa, Y. (1989). Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 162-166.
- Noda, M., and Takahashi, C. (2007). Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. *Cancer Sci* 98, 1659-1665.
- Oakman, C., Viale, G., and Di Leo, A. Management of triple negative breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 19, 312-321.
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R. M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D. B., *et al.* (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107, 789-800.
- Ottaviano, A. J., Sun, L., Ananthanarayanan, V., and Munshi, H. G. (2006). Extracellular matrix-mediated membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression in pancreatic ductal cells is regulated by transforming growth factor-beta1. *Cancer research* 66, 7032-7040.
- Ozaki, T., and Nakagawara, A. (2011). p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol* 2011, 603925.
- Padua, D., and Massague, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 19, 89-102.
- Paiva, C. E., Drigo, S. A., Rosa, F. E., Moraes Neto, F. A., Caldeira, J. R., Soares, F. A., Domingues, M. A., and Rogatto, S. R. Absence of transforming growth factor-beta type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. *Ann Oncol* 21, 734-740.
- Pardali, K., and Moustakas, A. (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1775, 21-62.
- Pesta, M., Kulda, V., Topolcan, O., Safranek, J., Vrzalova, J., Cerny, R., and Holubec, L. (2009). Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC. *Anticancer research* 29, 4535-4539.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Polyak, K., and Kalluri, R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a003244.
- Qin, B.Y., Chacko, B.M., Lam, S.S., de Caestecker, M.P., Correia, J.J., Lin, K. (2001) Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Molecular Cell* 6: 1303-1312.
- Qin, B.Y., Lam, S.S., Correia, J.J., Lin, K. (2002) Smad3 allosteric links TGF- β receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Development* 16: 1950-1963.
- Rabien, A., Burkhardt, M., Jung, M., Fritzsche, F., Ringsdorf, M., Schick Tanz, H., Loening, S. A., Kristiansen, G., and Jung, K. (2007). Decreased RECK expression indicating proteolytic imbalance in prostate cancer is associated with higher tumor aggressiveness and risk of prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy. *European urology* 51, 1259-1266.
- Radisky, E. S., and Radisky, D. C. (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15, 201-212.

- Reddy, K. B., Nabha, S. M., and Atanaskova, N. (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer metastasis reviews* 22, 395-403.
- Remacle, A., McCarthy, K., Noel, A., Maguire, T., McDermott, E., O'Higgins, N., Foidart, J. M., and Duffy, M. J. (2000). High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *International journal of cancer* 89, 118-121.
- Rhee, J. S., and Coussens, L. M. (2002). RECKing MMP function: implications for cancer development. *Trends Cell Biol* 12, 209-211.
- Ross, J. S., and Fletcher, J. A. (1999). The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Seminars in cancer biology* 9, 125-138.
- Safina, A., Ren, M. Q., Vandette, E., and Bakin, A. V. (2008). TAK1 is required for TGF-beta 1-mediated regulation of matrix metalloproteinase-9 and metastasis. *Oncogene* 27, 1198-1207.
- Santibanez, J. F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121, 233-251.
- Sartorius, C. A., Harvell, D. M., Shen, T., and Horwitz, K. B. (2005). Progestins initiate a luminal to myoepithelial switch in estrogen-dependent human breast tumors without altering growth. *Cancer research* 65, 9779-9788.
- Sasahara, R. M., Brochado, S. M., Takahashi, C., Oh, J., Maria-Engler, S. S., Granjeiro, J. M., Noda, M., and Sogayar, M. C. (2002). Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer detection and prevention* 26, 435-443.
- Schedin, P., and Keely, P. J. Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a003228.
- Schedin, P., Strange, R., Mitrenga, T., Wolfe, P., and Kaeck, M. (2000). Fibronectin fragments induce MMP activity in mouse mammary epithelial cells: evidence for a role in mammary tissue remodeling. *Journal of cell science* 113 (Pt 5), 795-806.
- Schmidhauser, C., Bissell, M. J., Myers, C. A., and Casperson, G. F. (1990). Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine beta-casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 9118-9122.
- Shackney, S. E., and Shankey, T. V. (1997). Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* 29, 1-27.
- Shah, F. D., Shukla, S. N., Shah, P. M., Shukla, H. K., and Patel, P. S. (2009). Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. *Indian journal of cancer* 46, 194-202.
- Shea-Eaton, W. K., Lee, P. P., and Ip, M. M. (2001). Regulation of milk protein gene expression in normal mammary epithelial cells by tumor necrosis factor. *Endocrinology* 142, 2558-2568.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shibue, T., and Weinberg, R. A. Metastatic colonization: settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment. *Seminars in cancer biology* 21, 99-106.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., and Jemal, A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: a cancer journal for clinicians* 61, 212-236.

- Silveira Correa, T. C., Massaro, R. R., Brohem, C. A., Taboga, S. R., Lamers, M. L., Santos, M. F., and Maria-Engler, S. S. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. *Journal of cellular biochemistry* 110, 52-61.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, NY)* 235, 177-182.
- Song, S. Y., Son, H. J., Nam, E., Rhee, J. C., and Park, C. (2006). Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. *Eur J Cancer* 42, 101-108.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.
- Span, P. N., Sweep, C. G., Manders, P., Beex, L. V., Leppert, D., and Lindberg, R. L. (2003). Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. *Cancer* 97, 2710-2715.
- Sternlicht, M. D. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* 8, 201.
- Sternlicht, M. D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
- Suarez-Cuervo, C., Merrell, M. A., Watson, L., Harris, K. W., Rosenthal, E. L., Vaananen, H. K., and Selander, K. S. (2004). Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clinical & experimental metastasis* 21, 525-533.
- Sun, L., Diamond, M. E., Ottaviano, A. J., Joseph, M. J., Ananthanarayan, V., and Munshi, H. G. (2008). Transforming growth factor-beta 1 promotes matrix metalloproteinase-9-mediated oral cancer invasion through snail expression. *Mol Cancer Res* 6, 10-20.
- Takagi, S., Simizu, S., and Osada, H. (2009). RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. *Cancer research* 69, 1502-1508.
- Takahashi, C., Sheng, Z., Horan, T. P., Kitayama, H., Maki, M., Hitomi, K., Kitaura, Y., Takai, S., Sasahara, R. M., Horimoto, A., *et al.* (1998). Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13221-13226.
- Takemoto, N., Tada, M., Hida, Y., Asano, T., Cheng, S., Kuramae, T., Hamada, J., Miyamoto, M., Kondo, S., and Moriuchi, T. (2007). Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 58, 376-383.
- Takeuchi, T., Hisanaga, M., Nagao, M., Ikeda, N., Fujii, H., Koyama, F., Mukogawa, T., Matsumoto, H., Kondo, S., Takahashi, C., *et al.* (2004). The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10, 5572-5579.
- Tetu, B., Brisson, J., Wang, C. S., Lapointe, H., Beaudry, G., Blanchette, C., and Trudel, D. (2006). The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res* 8, R28.
- Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005). Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87, 287-297.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

- Vernon, A. E., and LaBonne, C. (2004). Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol* 14, R719-721.
- Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2002). Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 118, 211-215.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-839.
- Welch, D. R., Steeg, P. S., and Rinker-Schaeffer, C. W. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Res* 2, 408-416.
- Wiercinska, E., Naber, H. P., Pardali, E., van der Pluijm, G., van Dam, H., and Ten Dijke, P. (2010). The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast cancer research and treatment*.
- Wilson, C. A., Cajulis, E. E., Green, J. L., Olsen, T. M., Chung, Y. A., Damore, M. A., Dering, J., Calzone, F. J., and Slamon, D. J. (2005). HER-2 overexpression differentially alters transforming growth factor-beta responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 7, R1058-1079.
- Wu, Z. S., Wu, Q., Yang, J. H., Wang, H. Q., Ding, X. D., Yang, F., and Xu, X. C. (2008). Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *International journal of cancer* 122, 2050-2056.
- Wurtz, S. O., Schrohl, A. S., Mouridsen, H., and Brunner, N. (2008). TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer--an update. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 47, 580-590.
- Xu, J., Wu, S., and Shi, X. Expression of matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in osteosarcoma. *J Orthop Res* 28, 1621-1625.

LISTA DE ANEXOS

1. **Súmula curricular**
2. **Artigo publicado:** Figueira, R. C., *Gomes, L. R.*, Neto, J. S., Silva, F. C., Silva, I. D., and Sogayar, M. C. (2009). Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. *BMC Cancer* 9, 20
3. **Artigo publicado:** *Gomes, L. R.*, Terra, L. F., Sogayar, M. C., and Labriola, L. (2011). Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Curr Pharm Biotechnol*.
4. **Manuscripto submetido:** Gomes, L.R., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Labriola, L., Sogayar, M. C. TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMPs inhibitors through p38 MAPK and ERK $\frac{1}{2}$ in highly invasive breast cancer cells.

Súmula Curricular

Luciana Rodrigues Gomes

1. Formação

Formação Acadêmica

2007 Doutorado em Bioquímica
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, Brasil

2003-2006 Graduação em Bacharelado em Química
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Formação complementar

2009 Estágio de Doutorado Sanduíche
Life Science Division, Laurence Berkeley National Laboratory, LBNL,
Berkeley, California, EUA

2003-2006 Iniciação Científica
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São
Paulo, USP, Brasil

2. Atuação profissional

2008-Atual Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento Funcional: Doutorado Direto,
Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Orientador (a): Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Projeto: Mecanismos Moleculares de regulação da expressão dos
inibidores de MMPs em carcinoma mamário humano: papel de RECK em
invasão e metástase tumoral
Instituição: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

2009 Vínculo: Bolsista CAPESP, Enquadramento Funcional: Doutorado
Sanduíche, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Orientador (a): Profa. Dra. Mina J. Bissell
Projeto: Análise funcional de RECK em culturas celulares tridimensionais
de carcinoma mamário humano.
Instituição: Life Science Division, Laurence Berkeley National Laboratory,
LBNL, Berkeley, California, EUA

- 2007** Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento Funcional: Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Orientador (a): Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Projeto: Papel das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) na regulação transcricional dos inibidores de metaloproteinases de matriz (TIMPs e RECK) em modelo de carcinoma mamário humano
Instituição: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, Brasil
- 2004-2007** Vínculo: Bolsista FAPESP, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva
Orientador (a): Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Projeto: Estudo do papel da fosfatase induzida por p53 (PPM1D/Wip1) na progressão de carcinoma prostático.
Instituição: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, Brasil

3. Produção bibliográfica

FUJITA, A, **GOMES, LR**, SATO, JR, YAMAGUCHI, R, THOMAZ, CE, SOGAYAR, MC, MIYANO, S. *Multivariate gene expression analysis reveals functional connectivity changes between normal/tumoral prostates*. BMC systems biology, v. 2, p. 106, 2008

FUJITA, A, FESTA, F, **GOMES, LR**, OBA-SHINJO, SM, MARIE, SKN, FERREIRA, CE, SOGAYAR, MC. *Identification of COL6A1 as a differentially expressed gene in human astrocytomas*. Genetics and Molecular Research, v. 7, p. 371-378, 2008.

FIGUEIRA, RCS, **GOMES, LR**, NETO JS, SILVA, FC, SILVA, ID, SOGAYAR, MC. *Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential*. BMC Cancer, v. 14, p. 20, 2009.

BUCHANAN C, STIGLIANO I, GARAY-MALPARTIDA HM, **RODRIGUES GOMES, L**, PURICELLI L, SOGAYAR, MC, BAL DE KIER JOFFÉ E, PETERS MG. *Glypican-3 reexpression regulates apoptosis in murine adenocarcinoma mammary cells modulating PI3K/Akt and p38MAPK signaling pathways*. Breast Cancer Research and Treatment, v. 119, p. 559-574, 2010.

GOMES, LR, TERRA, LF, SOGAYAR, MC, LABRIOLA, L. *Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Cancer Progression and Metastasis*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2011.

FUJITA, A, SATO, JR, KOJIMA, K, **GOMES, LR**, NAGASAKI, M, SOGAYAR, MC, MIYANO, S. *Identification of Granger causality between gene sets*. Journal of Bioinformatics and Computational Biology. v. 08, p. 679, 2010

GOMES, LR, TERRA, LF, WAILEMANN, RAM, LABRIOLA, L, SOGAYAR, MC. *TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMPs inhibitors through p38 MAPK and ERK $\frac{1}{2}$ in highly invasive breast cancer cells. (submetido)*

GOMES, LR, FUJITA, A, MOTT, JD, SOARES, FA, BISSELL, MJ, LABRIOLA, L, SOGAYAR, MC. *A Role for RECK in Breast Cancer: Modulation of Matrix Metalloproteinase-9 and Cellular Invasion. (em preparação)*

4. Prêmios e títulos

2011	AACR International Travel Grant, American Association for Cancer Research (102 nd AACR)
2011	Seleção para Simpósio Cone Sul, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)
2010	Membro associado da American Association for Cancer Research, American Association for Cancer Research (AACR)
2009	AACR International Travel Grant, American Association of Cancer Research (100 th AACR)
2006	Menção Honrosa no 14º Simpósio de Iniciação Científica da USP, Pro-Reitoria de Pesquisa - USP
2006	Prêmio no Concurso de Painéis da XXII Semana da Química, Instituto de Química - USP
2005	Menção Honrosa no 13º Simpósio de Iniciação Científica da USP, Pro-Reitoria de Pesquisa da USP

5. Resumos publicados em anais de congresso (selecionados de um total de 14)

GOMES, L R , TERRA, LF, WAILEMANN, RAM, LABRIOLA, L, SOGAYAR, MC. *TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMPs inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive human breast cancer cell*. In: 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2011, Orlando. 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (102nd AACR), 2011.

GOMES, LR, LABRIOLA, L, MOTT, JD, BISSELL MJ, SOGAYAR, MC. *A role for RECK in breast cancer: modulation of matrix metalloproteinase-9 and cellular invasion*. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry (SBBq), 2010

GOMES, LR, LABRIOLA, L, FIGUEIRA, RCS, SOGAYAR, MC. *TGF- β 1 induces coordinate expression of MMPs and their inhibitors human breast cancer cell lines*. In: 100th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, 2009, Denver. 100th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (100th AACR), 2009.

Eventos Internacionais

Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR), nas edições de 2009 e 2011 (Congresso)

Eventos Nacionais

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), nas edições de 2004, 2005, 2007, 2008, 2010, 2011 (Congresso)

VIII São Paulo Research Conferences, Câncer: da Biologia Molecular ao Tratamento. 2007 (Simpósio)

58º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 2006 (Congresso)

XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular. 2006 (Congresso).

IX Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular. 2006 (Simpósio)

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

13º Jornada Nacional de Iniciação Científica. 2006 (Simpósio)