BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
21.650

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs)
E DE SEUS INIBIDORES (TIMPs E RECK) EM MODELO DE
PROGRESSÃO TUMORAL DE CÂNCER DE MAMA E SUA
CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

Rita de Cássia Savio Figueira

ORIENTADORA: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica - USP**

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 07/03/2006

Sete de março de Dois Mil e Seis

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011659

Ficha Catalográfica

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

F475e Figueira, Rita de Cássia Savio
Expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e de seus
inibidores (TIMPs e RECK) em modelo de progressão tumoral
de câncer de mama e sua correlação com dados clínico-
patológicos / Rita de Cássia Savio Figueira. -- São Paulo,
2006.
159p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Sogayar, Mari Cleide

1. Expressão gênica 2. Bioquímica molecular 3. Carcinoma
mamário I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD

“Expressão de metaloproteinases de matriz (MMPS) e de seus inibidores (TIMPS e RECK) em modelo de progressão tumoral de câncer de mama e sua correlação com dados clínicos-patológicos”

RITA DE CÁSSIA SAVIO FIGUEIRA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. EDUARDO MORAES REGO REIS
IQ – USP

Profa. Dra. MARIA MITZI BRENTANI
FM – USP

SÃO PAULO
07 DE ABRIL 2006

UM DIA VOCÊ APRENDE QUE...

*Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido,
O mundo não pára para que você o conserte.
Aprende que o tempo não é algo que possa voltar atrás.
Portanto, plante seu jardim e decore sua alma,
Ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.*

*E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte,
E que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.
E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!
Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar,
Se não fosse o medo de tentar.*

William Shakespear

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, exemplos de amor e perseverança.

Ao meu irmão, Cezar, pela amizade.

Ao Murilo, pelo carinho e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

UM DIA VOCÊ APRENDE QUE...

Aprende que o importante não é o que você tem na vida,

Mas quem você tem na vida.

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

William Shakespeare

À Profa. Mari Cleide Sogayar pela oportunidade e pelo convívio durante esses cinco anos. Muito obrigada pela orientação, pela confiança, pelo apoio incondicional e, sobretudo, pela amizade.

À querida Maki, minha supervisora durante parte da Iniciação Científica, peça chave na minha formação acadêmica. Muito obrigada por tudo que você me ensinou, pela dedicação, pela confiança, pelo incentivo que permanece até os dias de hoje e pela amizade.

À Sheila por tudo que me ensinou durante esses anos. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar ao lado de uma pessoa como você, exemplo de dedicação e paciência, sempre disposta a ensinar. Muito obrigada pela convivência, pelas discussões científicas e pelas nossas longas conversas não científicas.

À Marina, aluna de Iniciação Científica, pelo seu jeito especial e cativante de viver a ciência...

Aos amigos do "Grupo RECK" Sheila, Marina, Marcos, Antero, Fernanda Festa e Christian pelas nossas longas discussões. Muito obrigada por todas as críticas, pelas sugestões, pelo incentivo constante e pela nossa amizade.

À Profa. Anamaria Camargo do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (LMBG) por disponibilizar as amostras de tumores de mama utilizadas neste estudo e pelo uso do seu laboratório para a realização de experimentos. Muito obrigada pela disponibilidade e pelas sugestões e discussões. À Paula pelo auxílio no processamento das amostras, por nossas longas conversas científicas e não científicas e pela amizade. Ao Ricardo por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas. Muito obrigada pelos ensinamentos e por todas as discussões a respeito dos ensaios de Real Time PCR. À Valéria, Ana Christina e Felícia pelo auxílio no levantamento dos dados clínico-patológicos e pelo apoio. A todos do LMBG pela disponibilidade.

Ao Dr. Adalberto Abrão Siufi do Hospital do Câncer Alfredo Abrão-MS pela coleta das amostras de tumores de mama e de borda normal adjacente utilizadas neste estudo. Ao Prof. Ismael Guerreiro da Silva da UNIFESP por disponibilizar estas amostras. Muito obrigada pela confiança e, principalmente pelo incentivo. À Nayara Correa Nogueira de Souza pelo auxílio no levantamento dos dados clínico-patológicos e ao técnico Márcio Alexandre Custódio pelo auxílio na seleção das amostras.

Ao Dr. Fernando Soares do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo pela contribuição ativa e esforços dispensados na realização e análise dos ensaios de Tissue array. Muito obrigada pelas sugestões, pela disponibilidade e pela valiosa contribuição. À equipe responsável pela montagem das lâminas e pela realização dos ensaios de Tissue array Sueli Nonogaki, José Ivanildo Neves e Carlos Ferreira Nascimento pela seriedade e pela competência.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo pela organização dos prontuários e pelo atendimento exemplar.

Às Profas. Anamaria Camargo (Instituto Ludwig) e Maria Aparecida Nagai (Faculdade de Medicina, USP) pelas amostras de linhagens celulares de carcinoma mamário humano gentilmente cedidas.

Ao Prof. Matthew Hoffman (NIH) pela doação do MATRIGEL™ utilizado na realização dos experimentos.

Ao Prof. Roger Chamas (Faculdade de Medicina, USP) pelo auxílio nos experimentos de invasão celular *in vivo*. Muito obrigada pela disponibilidade e pelas sugestões.

Ao Prof. José Mauro Granjeiro (Faculdade de Odontologia, USP) pelo auxílio nos experimentos de zimografia, pelas discussões e, sobretudo, pela amizade. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com uma pessoa que é exemplo de determinação. Aos seus alunos Renato e Everdan pelas colaborações, pela amizade e pela troca de conhecimentos entre biólogos e dentistas.

Ao Prof. Hugo Armelin (Instituto de Química, USP) pela presteza em resolver os problemas burocráticos relacionados ao meu ingresso na Pós-graduação.

À Profa. Sylvia Stuchi (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP) pelo incentivo e por todas as valiosas sugestões na fase inicial do desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Thelma Zorn do Departamento de Embriologia e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pela oportunidade de realizar minha primeira Iniciação Científica. Ao Maurício Soto, meu primeiro supervisor na carreira científica, pela paciência e por tudo que me ensinou a respeito da arte de fazer ciência. Muito obrigada pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pela amizade. Ao Sebastian por tudo que aprendemos juntos.

À Angelita pelo auxílio nos experimentos de metástase experimental e pela competência. À Fernanda Festa e ao Léo por compartilharem seus conhecimentos em ensaios de Real Time PCR. Muito obrigada pela disponibilidade, pela paciência e pela amizade. Ao Newton pelo auxílio com os animais e pelas sugestões.

Aos Profs. Bayardo Baptista, Sandro Marana e Vilma Martins pela análise crítica deste trabalho durante o exame de qualificação. Muito obrigada por todas as sugestões.

Aos revisores desta tese: Karin, Maki, Sheila, Vitor, Léo e Murilo pela disponibilidade e por contribuírem com seus conhecimentos. Ao Léo por estar sempre disposto a solucionar minhas inúmeras dúvidas e problemas computacionais e ao Murilo por todo auxílio na formatação do texto e das figuras. MUITO obrigada!

Aos amigos que já deixaram o laboratório Áurea, Maki, Fernanda Ortis, Lúcia Helena, Mário, Katlin, Cleber, Mariana, Wagner, Sheila, Ana Paula, Diana... obrigada por tudo...

À Ana Carolina, Ana Paula, André, Angelita, Antero, Christian, Fernanda, Fernando, Gabriela, Luciana Cruz, Luciana Gomes, Karin, Leticia, Leonardo, Marina, Marcos, Sheila, Tatiana, Tatiane, Theri, Vitor, Wagner e a todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) e da Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas (UIPH) pela valiosa troca de conhecimentos e pelo convívio.

Aos amigos Antero, Fernanda, Gabriela, Karin, Leticia, Leonardo, Sheila, Theri, Ricardo e Wagner pelo convívio dentro e fora do ambiente de trabalho. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, troca de conhecimentos e, principalmente, pelos ÓTIMOS momentos compartilhados.

Ao grupo técnico do laboratório Zizi, Débora, Ricardo, Sandra, Patrícia, Luana, Rafael e Isnar por todos os excelentes serviços prestados. À secretária Dona Helena pela admirável competência.

Às amigas Luciana, Irina, Priscila e Sandra pela nossa amizade cultivada há mais de dez anos. Às amigas e aos amigos Camila, Juliana Narita, Juliana Tieme, Mariana, Monalisa, Renata, Sinistro, Júlio, Blanes, Guilherme, PCR, Pererê e Paulinho pela convivência e pelos ótimos momentos que passamos juntos durante toda a graduação e pós-graduação. Obrigada por fazerem parte da minha formação e pela nossa amizade que dura até hoje.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pelo apoio, pelo incentivo constante e por estarem ao meu lado em TODOS os momentos, independente da distância. Obrigada por TUDO.

Ao meu irmão pelo apoio e pela "torcida".

Ao Murilo pelo grande apoio intelectual e emocional na finalização deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio incondicional, pelo companheirismo e pelo amor sempre tão presente. À Elvira, ao Ivaldir e à Nola por todo apoio e carinho.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e me incentivaram.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

A todos os funcionários do Instituto de Química pelos serviços prestados.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos nesta trajetória.

LISTA DE ABREVIATURAS

36B4	Fosfoproteína ribossomal ácida
Abs	Absorbância
ACS	<i>American Cancer Society</i>
AP-2	<i>Activator protein-2</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento de epidermal
EMT	Transição epitélio-mesênquima
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento epidermal
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase
hRECK	RECK de humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz
MOPS	Ácido 3-N-Morfolino propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
OD	Densidade óptica
pb	Pares de base
PBSA	Solução salina tamponada com fosfato
PCPE	<i>Procollagen c-terminal proteinase enhancer protein</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
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 <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	<i>Reverse Transcription PCR</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Eletroforesis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SG	Sobrevida Global

SLD	Sobrevida Livre de Doença
SPI	Inibidor de serina protease
SSC	Solução Salina contendo citrato de sódio
TBST	<i>Tris Buffered Saline Tween 20</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TFPI-2	<i>Tissue factor pathway inhibitor-2</i>
TGF	Fator de crescimento transformador
TIMP	Inibidor tecidual de MMPs
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
Tris	Tris-Hidroximetil-Amino-Metano

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O câncer de mama	1
1.2. A metástase e o câncer de mama	3
1.3. Interação célula-matriz extracelular e a metástase tumoral	4
1.4. As Metaloproteínas de Matriz (MMPs) - estrutura e função	8
1.5. As MMPs no câncer	12
1.5.1. <i>Neoplasia inicial</i>	13
1.5.2. <i>Progressão maligna</i>	13
1.5.3. <i>Angiogênese</i>	15
1.5.4. <i>Proliferação celular</i>	16
1.6. As MMPs no câncer de mama	17
1.7. Os TIMPs como inibidores de Metaloproteínas de Matriz	18
1.8. Os TIMPs como proteínas multifuncionais no câncer	20
1.8.1. <i>Atividade supressora de tumor dos TIMPs</i>	21
1.8.2. <i>Atividade promotora de tumor dos TIMPs</i>	22
1.9. Valor diagnóstico e terapêutico dos TIMPs no câncer	24
1.10. Os TIMPs no câncer de mama	25
1.11. Os inibidores endógenos das MMPs	26
1.12. Gene supressor de metástase RECK	27
2. OBJETIVO GERAL	32
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Plasmídeos	34
4.2. Linhagens celulares	34
4.3. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos	35
4.4. Soluções	36
4.5. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares	36
4.6. Manutenção das linhagens celulares em diferentes substratos	36
4.7. Ensaio de curva de crescimento celular em substrato sólido	37
4.8. Ensaio de invasão celular <i>in vitro</i>	38
4.9. Ensaio de formação de colônia em meio semi-sólido	39
4.10. Ensaio de metástase experimental em camundongo <i>nude</i>	39
4.11. Ensaio de atividade enzimática – Zimograma (Heussen & Dowdle, 1980)	40
4.12. Extração e purificação de RNA total de células de mamíferos	41
4.13. Ensaio de Northern Blot	42
4.13.1. Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído (Thomas, 1980) e transferência para membrana de nylon	42
4.13.2. Marcação de sonda radioativa	43
4.13.3. Hibridização molecular radioativa e lavagem dos filtros	44
4.13.4. Autoradiografia	44
4.14. Ensaio de Real Time PCR	44

4.14.1.	Síntese da primeira fita do cDNA.....	44
4.14.2.	Controle da qualidade do cDNA	45
4.14.3.	Desenho dos <i>primers</i>	46
4.14.4.	Reação de <i>Real-Time PCR</i>	47
4.14.4.1.	Determinação da concentração final de <i>primers</i>	49
4.14.4.2.	Determinação da eficiência dos <i>primers</i>	50
4.14.4.3.	Confirmação da expressão diferencial.....	50
4.15.	Amostras teciduais de carcinoma mamário humano.....	51
4.15.1.	Obtenção dos dados clínico-patológicos	51
4.16.	<i>Tissue array</i>	52
4.17.	Análise estatística dos dados	53
5.	RESULTADOS.....	54
6.	DISCUSSÃO	114
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	143
8.	BIBLIOGRAFIA	146
9.	Curriculum Vitae.....	154

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: As principais etapas da metástase tumoral.....	5
Figura 2: Balanço proteinase/inibidor e a transição para estados patológicos.	7
Figura 3: Domínios estruturais básicos e organização estrutural de MMPs envolvidas em carcinogênese.	9
Figura 4: Mecanismos de sinalização celular regulados pela atividade das MMPs.....	11
Figura 5: Domínios estruturais dos TIMPs.	19
Figura 6: Efeitos paradoxais dos TIMPs no comportamento da célula tumoral.	21
Figura 7: Organização estrutural da proteína RECK humana.	28
Figura 8: Regulação da atividade das MMPs pelo inibidor associado à membrana, RECK.	30
Figura 9: Morfologia das linhagens celulares de carcinoma mamário humano em plástico cultivadas em diferentes densidades.	57
Figura 10: Morfologia das linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).	58
Figura 11: Padronização do ensaio de invasão celular <i>in vitro</i> em placas do tipo Transwell® utilizando membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) como substrato para invasão.....	60
Figura 12: Ensaio de invasão celular <i>in vitro</i> em placas do tipo Transwell® utilizando membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) como substrato para invasão.	63
Figura 13: Ensaio de formação de colônia em suspensão de agarose mole (0,3%) e dura (0,9%) das diferentes linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	64
Figura 14: Número de colônias formadas após 30 dias de crescimento das diferentes linhagens celulares de carcinoma mamário humano em suspensão de agarose mole (A, 0,3%) e dura (B, 0,9%).	64
Figura 15: Metástase experimental de linhagens de carcinoma mamário humano em pulmão de camundongos imunodeficientes.	66
Figura 16: Perfil do crescimento de linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) mantidas de 1 (24 horas) a 9 (261 horas) dias em cultura.	68

Figura 17: Tempo de dobramento médio das linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).	70
Figura 18: Densidade de saturação das linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).	70
Figura 19: Morfologia e densidade celular das linhagens celulares de carcinoma mamário cultivadas durante 3 e 5 dias em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).	73
Figura 20: Curvas de regressão linear obtidas para determinação da eficiência dos <i>primers</i> utilizados para quantificação da expressão gênica em linhagens celulares de carcinoma mamário humano nos experimentos de <i>Real-Time PCR</i>	74
Figura 21: Análise da expressão gênica de metaloproteinases de matriz em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	79
Figura 22: Atividade gelatinolítica de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) em linhagens celulares de carcinoma mamário humano detectada através de ensaio de Zimografia.	81
Figura 23: Análise da expressão gênica de inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	83
Figura 24: Análise da expressão gênica do inibidor de metaloproteinases de matriz associado à membrana, RECK, em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	85
Figura 25: Perfil de expressão do gene supressor de metástase <i>RECK</i> em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	86
Figura 26: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	89
Figura 27: Fracionamento de RNA total em gel de agarose contendo tiocianato de guanidina para verificação da qualidade e da integridade da preparação.	91
Figura 28: Curvas de regressão linear obtidas para determinação da eficiência dos <i>primers</i> utilizados para quantificação da expressão gênica em amostras teciduais nos experimentos de <i>Real-Time PCR</i>	98
Figura 29: Análise da expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.	100
Figura 30: Correlação entre os níveis de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de carcinomas primários de mama.	102

Figura 31: Análise do balanço proteinase / inibidor em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.....	104
Figura 32: Detecção dos níveis de expressão protéica de RECK em amostras de tumores primários de mama.	111
Figura 33: Curva de Sobrevida Global das pacientes incluídas no estudo da expressão protéica de RECK através de ensaios de <i>Tissue Microarray</i>	113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de <i>Real-Time PCR</i>	47
Tabela 2: Aspectos gerais das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas...54	
Tabela 3: Produção de metástase experimental em pulmão de camundongos <i>nude</i> por células de carcinoma mamário humano	65
Tabela 4: Análise estatística dos dados de densidade de saturação de linhagens celulares de carcinoma mamário humano quando cultivadas em plástico e em plástico revestido com MATRIGEL™, obtidos a partir dos ensaios de proliferação.	71
Tabela 5: Concentração final e eficiência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica em linhagens celulares de carcinoma mamário humano através de ensaios de <i>Real-Time PCR</i>	75
Tabela 6: Análise estatística dos dados de expressão gênica relativa de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens celulares de carcinoma mamário humano quando cultivadas em plástico e em plástico revestido com MATRIGEL™.	85
Tabela 7: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.	90
Tabela 8: Distribuição dos dados clínico-patológicos das 40 pacientes do Hospital do Câncer A. C. Camargo – Instituto Ludwig.	92
Tabela 9: Distribuição dos dados clínico-patológicos das 32 pacientes do Hospital do Câncer Alfredo Abrão.	95
Tabela 10: Distribuição categórica dos Dados Clínico-Patológicos das pacientes analisadas nos ensaios de <i>Real-Time PCR</i>	96
Tabela 11: Concentração final e eficiência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente através de ensaios de <i>Real-Time PCR</i>	99
Tabela 12: Análise da expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.	101
Tabela 13: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de tumores primários de mama.	103
Tabela 14: Análise do balanço proteinase / inibidor em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.	105

Tabela 15	106
Tabela 16	107
Tabela 17: Distribuição categórica dos Dados Clínico-Patológicos das pacientes incluídas no <i>Tissue Microarray</i>	109
Tabela 18: Relação entre os dados clínico-patológicos e o nível de expressão protéica de RECK detectado em ensaios de <i>Tissue Microarray</i>	112

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comumente detectado em mulheres de todo o mundo. Na maioria das pacientes, a causa de morte se deve, principalmente, à doença metastática que pode se desenvolver a partir do tumor primário. O processo metastático envolve uma complexa cascata de eventos, incluindo a quebra organizada dos componentes da matriz extracelular por metaloproteinases de matriz (MMPs). A atividade das MMPs é precisamente regulada por inibidores específicos, os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs). Dado seu papel na progressão tumoral, níveis elevados de MMPs têm sido associados com prognóstico desfavorável para pacientes com câncer. Por outro lado, sendo os TIMPs proteínas multifuncionais, níveis elevados de TIMP-1 e de TIMP-2 correlacionam com agressividade do tumor e prognóstico ruim em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. O gene supressor de metástase RECK codifica uma glicoproteína de membrana capaz de inibir a invasão e a metástase tumoral através da regulação negativa da atividade de MMPs envolvidas em carcinogênese: MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP). A fim de analisar o papel das MMPs e de seus inibidores (TIMPs e RECK) na progressão tumoral do câncer de mama, o perfil de expressão destes genes foi detectado, através de ensaios de *Real-Time PCR*, em um painel de cinco linhagens celulares de carcinoma de mama humano com diferentes potenciais invasivos e metastáticos e em 72 amostras teciduais de tumores primários de mama e 30 amostras teciduais de borda normal adjacente ao tumor. O perfil de expressão protéica de RECK foi avaliado em 236 amostras de tumores primários de mama através de ensaios de *Tissue Microarray*. Além disso, a atividade proteolítica das MMPs foi detectada em ensaios de Zimografia. Os resultados obtidos indicam que a progressão do câncer de mama humano está relacionada com um aumento dos níveis de expressão das MMPs e de seus inibidores específicos. O aumento dos níveis de expressão dos TIMPs parece

estar relacionado ao seu papel como proteína multifuncional que pode estar funcionando de maneira a promover, mais do que suprimir, a progressão tumoral. Níveis elevados da expressão protéica de RECK estão associados com pior prognóstico. No entanto, para pacientes em estádios clínicos avançados, altos níveis de expressão de RECK podem estar correlacionados com melhor prognóstico, dependendo do balanço MMP/inibidor. Os níveis de expressão das MMPs apresentaram correlação positiva em relação aos níveis de expressão de seus inibidores específicos, sugerindo a existência de fatores e vias de sinalização comuns envolvidas na regulação coordenada destes genes. Além disso, a síntese do inibidor pode estar relacionada a uma resposta celular ao aumento da expressão e atividade de proteases. O balanço transcricional enzima/inibidor favorece a enzima nas amostras tumorais e, de modo contrário, o inibidor específico nas amostras de borda normal, sugerindo o balanço como o principal fator na determinação da degradação da MEC em processos invasivos e metastáticos. Os resultados obtidos podem contribuir para um melhor entendimento da complexidade dos mecanismos envolvidos na metástase do câncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is among the most common tumors affecting women. Like most solid tumors, metastatic disease rather than the primary tumor itself is responsible for death. The metastatic process involves a complex cascade of events, including the organized breakdown of the extracellular matrix by matrix metalloproteinases (MMPs). The activity of these proteases is tightly regulated by specific inhibitors, known as tissue inhibitors of MMPs (TIMPs). Consistent with their role in tumor progression, high levels of a number of MMPs have been shown to correlate with poor prognosis in human cancers. On the other hand, TIMPs are multifunctional molecules with high levels of TIMP-1 and TIMP-2 having been shown to predict adverse prognosis and correlate with tumor aggressiveness in several different human cancers, including breast cancer. The RECK metastasis suppressor gene encodes a membrane-associated MMP regulator protein that is able to suppress tumor invasion and metastasis by negatively regulating MMPs involved in carcinogenesis, namely: MMP-2, MMP-9 and MMP-14 (MT1-MMP). In order to analyse the role of these genes in breast cancer progression, the expression levels of MMPs and theirs inhibitors were detected by Real Time PCR in a panel of five human breast cancer cell lines displaying different degrees of invasiveness and metastatic potential and in 72 primary breast cancer and 30 adjacent normal tissue specimens. The RECK protein expression profile was also examined in 236 primary breast cancer tissue specimens by Tissue Microarray technology. The proteolytic activity of MMPs was examined by Zymography. The results suggest that high expression levels of MMPs and their inhibitors are correlated with breast cancer progression. High levels of TIMP transcript may be involved in tumor-promoting activity as a result of their multifunctional role. Increased levels of the RECK protein are correlated with poor prognosis for the patient. However, high levels of RECK would be expected to confer a favorable prognosis to patients with advanced

disease. The expression levels of MMPs significantly correlated with the levels of TIMPs and may be explained by coordinate correlation of these molecules or, alternatively, the synthesis of an inhibitor may be a cellular reaction to the presence of the protease. The enzyme/inhibitor balance at the transcriptional level favors the enzyme in tumor tissue and the inhibitor in adjacent normal tissue. It is probably the parameter that will determine the matrix degradation at invasion and metastatic process. Our results are likely to contribute for better understanding of the complex mechanisms involved in breast cancer metastasis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer de mama

Estudos mostram que nos EUA em 2002, ano mais recente para o qual encontram-se dados disponíveis, o câncer foi responsável por 22,8% das mortes ocupando o 2º lugar entre as 15 causas mais frequentes de morte, perdendo apenas para doenças cardíacas (Jemal et al., 2006). Segundo estimativas para o ano de 2006, 1.399.790 novos casos de câncer serão diagnosticados nos EUA (ACS, 2006). No Brasil, as estimativas apontam que serão diagnosticados 472.050 novos casos de câncer em 2006 (INCA, 2005).

Atualmente, o câncer de mama é o tipo de câncer mais comumente detectado em mulheres de todo o mundo. Dentre os novos casos de câncer a serem diagnosticados em mulheres, segundo estimativas para os EUA em 2006, o câncer de mama ocupa o 1º lugar, sendo o responsável por 31% dos casos (212.920 casos) (ACS, 2006). O número de novos casos de câncer de mama estimados para o Brasil em 2006 é de 48.930, ocupando também o 1º lugar, sendo responsável pelo correspondente a 28% do total de casos de câncer a serem diagnosticados em mulheres (INCA, 2005).

Além disso, segundo dados do Ministério da Saúde de 2003, no Brasil o câncer de mama corresponde a 3ª causa mais frequente de morte por câncer na população, sendo a 2ª causa de morte por câncer entre as mulheres. Da mesma forma, segundo as estimativas mais recentes, em 2006 nos EUA o câncer de mama será responsável por 15% das mortes por câncer entre as mulheres, ocupando o 2º lugar dentre as 10 causas mais frequentes de morte por câncer entre as mulheres (ACS, 2006).

Os mecanismos que regulam a manutenção do estado diferenciado estão intrinsecamente associados ao câncer. A glândula mamária, que sofre repetidos ciclos de alterações morfológicas características, é considerada o tecido onde tal associação

é mais óbvia. Na puberdade ocorre a morfogênese ductal; na gravidez a expansão da árvore ductal está associada com alta taxa de proliferação celular; na lactação a diferenciação resulta em produção de leite e na involução a alta taxa de apoptose resulta em regressão ao estágio pré-gravidez. Tais alterações também ocorrem, de maneira menos intensa, durante cada ciclo estral e, em cada fase, existem diversas possibilidades para que o complexo mecanismo de remodelamento seja alterado e resulte em malignidade. Fatores de crescimento, hormônios, citocinas, moléculas da matriz extracelular (MEC), metaloproteinases de matriz (MMPs) e morfógenos exercem um papel crucial no desenvolvimento e no remodelamento da glândula bem como no câncer de mama (Bissell & Radisky, 2001).

Na maioria dos casos, os carcinomas de mama se originam do epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária. Clinicamente, este tipo de câncer pode se apresentar sob a forma de carcinoma *in situ*, no qual o tumor permanece confinado ao tecido mamário, e carcinoma invasivo, o qual em estádios mais avançados pode atravessar os limites teciduais e disseminar para outros órgãos do corpo. Dentre os tipos histológicos de carcinomas invasivos de mama, o carcinoma ductal invasivo apresenta a maior frequência (50-80% dos casos), seguido pelo carcinoma lobular invasivo, o qual corresponde a 5-15% dos casos (Weigelt et al., 2005).

O sistema TNM, baseado no tamanho do tumor (T), no acometimento de linfonodos (N) e na presença de metástases à distância (M) é o sistema mais utilizado na classificação e no estadiamento clínico e patológico do câncer de mama (Styblo e Wood, 1998). Além disso, a classificação tradicional dos tumores de mama baseia-se em características clínico-patológicas como, por exemplo, o tamanho do tumor primário, o grau histológico, o grau nuclear, o tipo histológico, a ocorrência de invasão linfovascular, a expressão de receptores de estrógeno e progesterona, a expressão de oncogenes (c-erb-B2, por exemplo) e a expressão de marcadores de taxa proliferativa (Ki-67, por exemplo).

Os aspectos biológicos do tumor são utilizados para um prognóstico estimado e para a seleção de um sistema de terapia apropriado. No entanto, uma das principais características do câncer de mama é a heterogeneidade clínica e histológica da doença. Desta forma, muitas vezes os parâmetros existentes não permitem a distinção entre tumores com características semelhantes que apresentam diferenças no curso clínico e na resposta a um mesmo tratamento (Pavelic & Gall-Troselj, 2001). Atualmente, os marcadores de prognósticos utilizados em câncer de mama são capazes de identificar um grupo de, aproximadamente, 30% de pacientes que apresentarão um curso clínico extremamente favorável ou ruim. Para os 70% restantes, dos quais 30% ainda irão desenvolver metástase à distância, novos marcadores moleculares são necessários para auxiliar na identificação de grupos de baixo e de alto risco, tornando possível a seleção daqueles pacientes que se beneficiariam de um tratamento sistêmico adjuvante (Weigelt et al., 2005).

Portanto, a possibilidade de distinguir tumores humanos morfológicamente similares pelo perfil de expressão gênica, ou seja, através da expressão diferencial de moléculas-alvo envolvidas em processos celulares como transformação, proliferação, invasão, metástase, angiogênese e resistência à terapia, é de extrema importância no diagnóstico precoce da doença, na avaliação do prognóstico do paciente e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas, maximizando a eficácia e minimizando a toxicidade do tratamento.

1.2. A metástase e o câncer de mama

A colonização de tecidos distantes por células tumorais é considerado o atributo mais grave do câncer. Na maioria das pacientes com câncer de mama, de modo semelhante à maioria dos pacientes que desenvolvem tumores sólidos, a causa de morte se deve, principalmente, à doença metastática que pode se desenvolver a partir do tumor primário. Caso o câncer de mama seja diagnosticado e tratado antes

de sua expansão, ou seja, quando o carcinoma ainda permanece confinado ao tecido mamário, as taxas de cura são elevadas. No entanto, caso a metástase tenha se desenvolvido, a taxa de sobrevida decai significativamente, dependendo da extensão e dos sítios secundários de colonização (Lee & Welch, 1997; Welch et al., 2000; Yang et al., 2004). Segundo dados do EUA, considerando-se os casos de câncer de mama diagnosticados entre os anos de 1995 e 2001, a taxa de sobrevida em 5 anos foi de 98% para pacientes que foram diagnosticadas quando o tumor encontrava-se localizado e de 26% nos casos em que se detectou metástase à distância no momento do diagnóstico (Jemal et al., 2006).

A progressão do câncer de mama envolve um processo de múltiplos estágios que resultam de uma série de alterações genéticas. Nesta progressão, a metástase à distância é considerada um evento molecular tardio. A caracterização de eventos moleculares tardios em células tumorais de fenótipo agressivo pode auxiliar na prevenção da metástase e no desenvolvimento de tratamentos mais específicos para metástases já estabelecidas. Embora muitos genes associados com a metástase do câncer de mama tenham sido identificados, o mecanismo de ação e a possibilidade do uso destes genes para distinção de células metastáticas de células não metastáticas permanece incipiente (Yang et al., 1997).

A Genética da metástase em geral e, mais especificamente, no caso do câncer de mama, é complexa e ainda pouco entendida. Embora muitos genes/proteínas estejam sendo identificados numa taxa de crescimento contínuo, um modelo compreensivo e unificador da interação entre eles requer estudos mais aprofundados.

1.3. Interação célula-matriz extracelular e a metástase tumoral

A metástase pode ser definida como o crescimento progressivo de células em um sítio que apresenta descontinuidade em relação ao tumor primário. A rota da expansão é irrelevante nesta definição. As células metastáticas são um grupo

especializado de células tumorais provenientes da massa de tumor primário, as quais adquiriram a habilidade de completar a cascata de múltiplos estágios da metástase. Inicialmente, as células tumorais sofrem alterações morfológicas que resultam em perda da polaridade, perda do contato com células vizinhas e aquisição de motilidade, evento denominado transição epitélio-mesênquima (EMT). Em um curto espaço de tempo, tais células migram, invadem a membrana basal epitelial e o estroma intersticial, intravasam, disseminam, extravasam e, eventualmente, proliferam em sítios secundários descontínuos do ambiente hospedeiro. As células metastáticas podem se dispersar via vasos sanguíneos, linfáticos, ou dentro de cavidades do corpo. Um dos mais importantes eventos da cascata metastática, após a EMT, compreende a degradação local dos componentes da MEC que funcionam como barreira física para a migração celular (Itoh & Nagase, 2002) (Fig. 1).

Figura 1: As principais etapas da metástase tumoral.

A primeira etapa da cascata metastática envolve a ocorrência de um evento denominado transição epitélio-mesênquima (1). Para que a invasão tecidual seja concluída deve ocorrer degradação dos componentes da MEC. Assim, células tumorais intravasam invadindo a circulação sistêmica (2), extravasam (3) e se estabelecem em um sítio secundário do ambiente hospedeiro (4) (Adaptado de Vernon et al., 2004).

A MEC compreende uma rede dinâmica de macromoléculas interativas como colágenos, proteínas não colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos que circundam os fibroblastos do estroma, proporcionando suporte mecânico para as células e

integridade estrutural para os tecidos (Itoh & Nagase, 2002; Ramirez & Rifkin, 2003). Além disso, tem sido demonstrado que a MEC exerce um papel instrutivo, fornecendo informações estruturais para integrinas e outras moléculas da superfície celular, e servindo como reservatório de fatores de crescimento e diferenciação celular, fatores angiogênicos e citocinas, que podem ser liberados e/ou ativados na medida em que as moléculas da matriz são degradadas (Aumailley & Gayraud, 1998). Assim, os componentes da MEC modulam o comportamento das células, criando ambientes capazes de regular diversos processos celulares.

O *turnover* da MEC é parte essencial de processos normais e patológicos como desenvolvimento, remodelamento tecidual, crescimento e diferenciação celular, invasão, metástase e angiogênese tumoral (Baker et al., 2002; Benaud et al., 1998; Egeblad & Werb, 2002; Werb et al., 1996). Interações que são estabelecidas entre proteinases extracelulares e seus inibidores regulam o remodelamento da MEC durante o desenvolvimento normal e durante o processo de transformação maligna. Os reguladores essenciais da proteólise são as metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores, os inibidores teciduais (TIMPs) e o inibidor associado à membrana, RECK. As células encontram-se num estado fisiológico quiescente quando a atividade das proteinases encontra-se em equilíbrio com a atividade de seus inibidores. Durante processos do desenvolvimento normal, ocorre um deslocamento do equilíbrio e as células adquirem capacidade invasiva. Este deslocamento é regulado, portanto, a homeostase pode ser restabelecida. Em condições patológicas, como, por exemplo, durante a progressão tumoral, ocorre perda da regulação do balanço entre proteinases e seus inibidores favorecendo o processo de invasão celular, como resultado de intensa proteólise. Desta forma, o mecanismo pelo qual uma célula maligna invade é similar ao que ocorre fisiologicamente, no entanto, a invasão tumoral

persiste, dado que células malignas são resistentes aos sinais regulatórios (Chang & Werb, 2001) (Fig. 2).

Figura 2: Balanço proteínase/inibidor e a transição para estados patológicos.

A homeostase e o reparo são resultado de reações químicas nas quais o equilíbrio é coordenado pela atividade de proteínases e seus inibidores. Quando a atividade das proteínases é balanceada pela atividade dos inibidores, as células encontram-se num estado fisiológico quiescente. A progressão de células normais por estádios pré-malignos até cânceres invasivos correlaciona com a regulação positiva da atividade das proteínases (Adaptado de Chang et al., 2001). *P*, proteínases (MMPs); *I*, inibidores de proteínases (TIMPs / RECK)

Na progressão do câncer de mama, as interações entre as proteínases e seus inibidores são complexas. Embora existam diferenças na expressão destes fatores, as quais correlacionam com diferenças na patologia do câncer mamário, não existem fatores individuais relacionados consistentemente com o prognóstico. Portanto, diferentes fatores provavelmente são importantes em diferentes estágios do processo, e o balanço na concentração relativa de proteínases e seus inibidores provavelmente

determina a degradação da MEC na invasão celular e na metástase do tumor de mama *in vivo* (Baker et al., 2002).

1.4. As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) - estrutura e função

As MMPs compreendem uma família de proteinases caracterizadas pela dependência de íons metálicos para atividade catalítica e pela potente habilidade em degradar proteínas estruturais da MEC. A primeira MMP descrita foi identificada em caudas de girinos através de sua atividade proteolítica capaz de degradar colágeno (Gross & Lapiere, 1962). Até o momento, foram identificadas 23 MMPs em humanos (Nagase et al., 2006).

As MMPs são referidas pelo seu nome ou de acordo com uma nomenclatura numérica sequencial reservada para as MMPs de vertebrados. Além disso, elas são frequentemente agrupadas de acordo com suas unidades de domínio estrutural. Todas as MMPs possuem uma seqüência de sinalização N-terminal (ou pré-domínio), a qual é removida após direcionamento da síntese da enzima para o retículo endoplasmático. Desta forma, a maioria das MMPs são secretadas; no entanto, algumas apresentam um domínio transmembrana e são expressas como enzimas de superfície celular. O pré-domínio é seguido por um pró-domínio, o qual mantém a enzima latente até que este seja removido ou modificado, e um domínio catalítico, que contém a região conservada de ligação ao zinco (Nagase & Woessner, 1999). Assim, as MMPs são secretadas para o compartimento extracelular na forma latente necessitando de uma etapa de ativação para exercer sua atividade proteolítica. Com exceção da MMP-7, da MMP-26 e da MMP-23, todas as MMPs possuem um domínio hemopexina/vitronectina conectado ao domínio catalítico através de uma alça de ligação. Quando presente, o domínio hemopexina influencia na ligação do TIMP, na ligação de certos substratos e em algumas atividades proteolíticas. A alça de ligação,

por outro lado, varia em tamanho e composição entre as diversas MMPs e também influencia na especificidade ao substrato. As Gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) são distinguidas, ainda, pela inserção de três repetições cabeça-cauda ricas em cisteína em seus domínios catalíticos. Estas inserções assemelham-se às repetições do tipo II do domínio de ligação ao colágeno da fibronectina, necessárias para ligação e clivagem do colágeno e da elastina. As MMPs do tipo membrana MT-MMPs possuem um domínio transmembrana de alça única e uma curta cauda C-terminal citoplasmática (MMP -14, -15, -16 e -24) ou um domínio C-terminal hidrofóbico que atua como um sinal de ancoramento à membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MMP-17 e MMP-25). Estes domínios exercem um papel essencial na localização de importantes eventos de proteólise que ocorrem na superfície celular (Sternlicht & Werb, 2001) (Fig. 3).

DOMÍNIOS ESTRUTURAIS BÁSICOS

GELATINASES (MMP-2/GELATINASE-A E MMP-9/GELATINASE-B)

METALOPROTEINASES DO TIPO MEMBRANA (MMP-14/MT1-MMP)

Figura 3: Domínios estruturais básicos e organização estrutural de MMPs envolvidas em carcinogênese.

Pre, pré-domínio ou peptídeo sinal; *Pro*, pró-domínio; *Zn*, sítio de ligação ao zinco no domínio catalítico; *II*, repetições do tipo II do domínio de ligação ao colágeno da fibronectina; *H*, alça de ligação; *TM*, domínio transmembrana. O domínio

hemopexina contém quatro repetições sendo a primeira e a última conectadas por uma ponte dissulfeto (Adaptado de Sternlicht et al., 2001).

Baseando-se na especificidade ao substrato, na similaridade da sequência e na organização dos domínios estruturais, as MMPs podem ser divididas em seis grupos: colagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, -10, -11), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), MMPs do tipo membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) e um grupo no qual estão incluídas sete MMPs que não são classificadas nas categorias anteriores (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27 e -28) (Visse & Nagase, 2003).

As MMPs são capazes de processar ou degradar inúmeras moléculas de superfície celular e proteínas pericelulares como, por exemplo, outras proteinases, inibidores de proteinases, fatores de coagulação, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento latentes, proteínas ligantes de fatores de crescimento, receptores de superfície celular, moléculas de adesão célula-célula e célula-MEC, praticamente, todas as proteínas estruturais da MEC. Desta forma, as MMPs regulam o ambiente celular de diversas maneiras: promovendo alterações das interações célula-célula e célula-matriz, a liberação e a ativação (ou inativação) de moléculas sinalizadoras e a ativação (ou inativação) de receptores de superfície celular (Sternlicht & Werb, 2001) (Fig. 4).

Figura 4: Mecanismos de sinalização celular regulados pela atividade das MMPs.

Atuando sobre proteínas estruturais da MEC e proteínas pericelulares e de superfície celular, as MMPs regulam o ambiente celular promovendo alterações das interações célula-célula e célula-matriz, a liberação e a ativação (ou inativação) de moléculas sinalizadoras e a ativação (ou inativação) de receptores de superfície celular (Adaptado de Sternlicht et al., 2001).

Dada a ampla variedade de proteínas que as MMPs são capazes de modificar, tais enzimas influenciam diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embriogênico, morfogênese tecidual, reparo de injúrias, doenças inflamatórias e câncer (Baker et al., 2002; Benaud et al., 1998; Itoh & Nagase, 2002; Sternlicht & Werb, 2001). Devido à habilidade de alterar o destino celular e o desenvolvimento, as MMPs necessitam estar sob um rígido controle. A expressão das MMPs é induzida por citocinas, por fatores de crescimento, pela transformação oncogênica e por interações célula-célula e célula-matriz. Além de serem reguladas ao nível transcricional, as MMPs podem ser controladas, ao nível protéico, pelos seus ativadores e inibidores endógenos e por fatores que influenciam

sua secreção, sua localização na superfície celular, e sua degradação. Além disso, organismos complexos expressam diversas MMPs, cada uma com seu próprio perfil de expressão, localização, ativação, inibição e degradação, bem como seu próprio, às vezes amplo, espectro de substratos preferenciais. Desta maneira, múltiplas modificações, cada uma com seu próprio perfil regulatório, controlam as diferentes funções das MMPs *in vivo* (Sternlicht & Werb, 2001).

1.5. As MMPs no câncer

As MMPs encontram-se presentes em grandes quantidades e são ativas, mais comumente, em cânceres malignos e ao redor destes do que em tecidos normais ou tecidos pré-malignos, com a maior expressão observada em áreas de invasão ativa, na interface tumor-estroma. A degradação da MEC por MMPs não apenas facilita a invasão tumoral mas, também, afeta o comportamento da célula tumoral conduzindo à progressão tumoral (Itoh & Nagase, 2002). Correlações positivas têm sido observadas entre os níveis de expressão das MMPs e indicadores de mau prognóstico em praticamente todos os tipos de cânceres humanos. Altos níveis de expressão de MMPs correlacionam com comportamentos tumorais mais agressivos e estádios clínicos avançados sendo que, em alguns casos, um aumento no nível de expressão das MMPs representa um preditor independente de curto tempo de sobrevivência livre de doença e sobrevivência global (Sternlicht & Bergers, 2000).

Além de seu papel na progressão maligna, através da remoção das barreiras físicas para a invasão e metástase tumoral, têm sido demonstrado que as MMPs estão envolvidas também nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer.

1.5.1. *Neoplasia inicial*

Um número significativo de estudos indica que influências estromais podem promover o desenvolvimento do câncer (Moinfar et al., 2000). Condições inflamatórias de fibrose aumentam o risco de câncer, e algumas síndromes de câncer familiar são resultado de mutações que produzem alterações estromais anteriores às alterações das células epiteliais. Estas são, também, condições em que MMPs do estroma são reguladas positivamente, e este aumento na atividade das MMPs pode contribuir para a susceptibilidade ao câncer (Sternlicht et al., 1999).

Diversos estudos com camundongos geneticamente modificados sugerem a participação das MMPs nos estágios iniciais do câncer. De maneira geral, camundongos transgênicos super-produtores de MMPs desenvolvem lesões hiperproliferativas espontâneas e um maior número de tumores ao receberem estímulos oncogênicos. Por outro lado, quando expostos ao mesmo estímulo, camundongos que sofreram *knock-out* gênico para várias das MMPs, tendem a desenvolver um número menor de tumores (Sternlicht & Werb, 2001).

1.5.2. *Progressão maligna*

Dados experimentais mostram que as MMPs contribuem ativamente para a progressão do câncer. Células de fenótipo benigno adquirem comportamento agressivo quando a atividade das MMPs é aumentada, ou quando a atividade de seus inibidores é diminuída. Por outro lado, células altamente malignas tornam-se menos agressivas quando seus níveis de MMPs são diminuídos ou quando a atividade das mesmas é suprimida (Sternlicht & Werb, 2001).

Durante a progressão maligna, as MMPs atuam facilitando a invasão e a metástase tumoral através da degradação de componentes estruturais da MEC

(Sternlicht & Werb, 2001). Diversas MMPs têm sido referidas como agonistas-chave na invasão, metástase e angiogênese tumoral, incluindo as MMPs -1, -2, -3, -9 e -14 (Sternlicht & Bergers, 2000). Na ausência da atividade das MMPs que degradam a matriz, células endoteliais seriam incapazes de penetrar na matriz, e células cancerosas seriam incapazes de atravessar as barreiras físicas que bloqueiam sua disseminação. No entanto, os mecanismos pelos quais as MMPs determinam o comportamento agressivo parecem ser mais complexos.

A invasão ocorre na interface tumor-hospedeiro, onde o tumor e as células do estroma trocam enzimas e citocinas que modulam a MEC local e estimulam a migração celular. A etapa limitante é a quebra da barreira de tecido conjuntivo pela ação das MMPs, que são invariavelmente reguladas positivamente no compartimento estromal de cânceres epiteliais invasivos (Chang & Werb, 2001). Além disso, as MMPs promovem a invasão tumoral por meio de outros mecanismos. Por exemplo, a regulação negativa de E-caderina está envolvida na progressão maligna de alguns tipos de cânceres, e os produtos de E-caderina, gerados pela ação das MMPs, atuam promovendo a invasão da célula tumoral. As MMPs podem, ainda, promover modificações fenotípicas tardias da EMT, as quais estão associadas com comportamentos malignos mais agressivos (Lochter et al., 1998; Sternlicht et al., 1999).

Evidências crescentes sugerem um papel dos componentes da MEC na metástase tumoral. Estudos revelaram que a expressão aumentada de diversos genes envolvidos com a arquitetura da MEC correlaciona com a progressão para um fenótipo metastático (Clark et al., 2000). As MMPs expõem os domínios críticos das moléculas da MEC, promovendo migração e metástase (Koshikawa et al., 2000). Além disso, moléculas não pertencentes à matriz têm sido associadas com a metástase

tumoral. Quimiocinas podem determinar a migração de células tumorais para órgãos específicos (Muller et al., 2001). Apesar das quimiocinas promoverem a força-guia para a metástase, as MMPs são necessárias para facilitar a migração em direção às quimiocinas, possivelmente através da regulação da biodisponibilidade destas moléculas (Chang & Werb, 2001).

1.5.3. Angiogênese

O processo de angiogênese é governado por um circuito de sinalização integrado, cuja modulação é dependente de fatores angiogênicos solúveis, citocinas e componentes insolúveis da MEC, localizados ao redor dos vasos envolvidos no processo (Chang & Werb, 2001). A angiogênese é necessária para o crescimento tumoral persistente, dado o fato de que os capilares formados são responsáveis pelas trocas gasosas e pelo suprimento de nutrientes (Carmeliet & Jain, 2000). Na ausência de crescimento vascular, a massa tumoral é restrita a um tamanho de, aproximadamente, 0,2mm mantendo-se por difusão tecidual. As MMPs são reguladoras essenciais durante várias fases do processo angiogênico, desde a deposição e quebra de membranas basais da estrutura vascular até a proliferação e migração das células endoteliais, que dependem da mobilização de fatores de crescimento latentes e *shedding* do receptor.

Durante a angiogênese, as MMPs podem apresentar tanto um papel pró-angiogênico, através da liberação de fatores pró-angiogênicos da matriz, quanto um papel anti-angiogênico, através da clivagem de componentes da MEC transformando-os em fatores anti-angiogênicos. É importante notar que os fragmentos da MEC clivados pelas MMPs também podem ser moléculas pró-angiogênicas. O balanço

entre os dois papéis é o responsável pelo resultado da ação das MMPs no processo de angiogênese (Chang & Werb, 2001).

1.5.4. *Proliferação celular*

No estabelecimento da autonomia do crescimento de células tumorais, dada a perda de mecanismos regulatórios, a sinalização entre os diversos tipos celulares com a massa tumoral é tão importante quanto a sinalização intracelular. Células tumorais de sucesso são aquelas que induzem a liberação de sinais proliferativos pelas células vizinhas. Tal fato envolve a liberação de domínios extracelulares de proteínas da superfície celular por um mecanismo envolvendo a proteólise mediada pelas MMPs. Além disso, a liberação de fatores ligados à matriz serve como um mecanismo principal para disponibilizar reguladores de crescimento para as células na ausência de contato físico direto. A atividade das MMPs governa a clivagem e a liberação de importantes fatores de crescimento e receptores da superfície celular (Chang & Werb, 2001). Estudos *in vitro* mostraram, por exemplo, que a MMP-2 e a MMP-9 são capazes de clivar proteoliticamente TGF- β latente, promovendo um mecanismo potencialmente importante para a ativação do TGF- β (Vu, 2001; Yu & Stamenkovic, 2000).

Os tópicos apresentados acima mostram que as MMPs podem participar de praticamente todos os estágios da evolução do câncer, tanto iniciais quanto tardios, expandindo, portanto, o potencial clínico de utilização de inibidores de MMPs (Sternlicht & Werb, 2001). A intervenção terapêutica no crescimento e na invasão tumoral, baseada na inibição da atividade de MMPs, está sob intensa investigação, sendo que muitos inibidores de matriz já estão em testes clínicos para a terapia do câncer (Vihinen & Kahari, 2002).

1.6. As MMPs no câncer de mama

Na glândula mamária normal, exceto em períodos do desenvolvimento, gravidez e involução, são detectados baixos níveis de expressão das MMPs (Benaud et al., 1998). No entanto, altos níveis de expressão podem ser detectados em condições patológicas como, por exemplo, no câncer de mama (Garbett et al., 1999; Garbett et al., 2000; Iwata et al., 1996). A expressão e a atividade de MMPs encontram-se elevadas em tecidos tumorais, quando comparadas com os níveis detectados em tecidos normais, sendo que este aumento está associado com um pior prognóstico (Wurtz et al., 2005). Dentre as diversas MMPs envolvidas na progressão do câncer de mama, Gelatinase-A (MMP-2) e Gelatinase B (MMP-9) têm sido relacionadas com estágios invasivos dada a habilidade de degradar o colágeno tipo IV, principal constituinte das membranas basais. Evidências recentes sugerem que estas proteinases também estão envolvidas em processos iniciais da tumorigênese e no crescimento do tumor de mama (Duffy et al., 2000).

A MMP-2 é expressa em estágios muito precoces do câncer de mama, acreditando-se que contribua para os primeiros eventos que levam à formação do tumor. Esta enzima está ausente em tecido de mama normal adulto, mas é expressa em alguns tumores benignos como, por exemplo, no fibroadenoma. Sua expressão torna-se mais relevante com o aumento do grau do tumor e a imunoreatividade da MMP-2 foi recentemente descoberta como sendo preditiva de menor tempo de sobrevida livre de doença e menor tempo de sobrevida global para pacientes com câncer de mama (Iwata et al., 1996; Polette et al., 1993; Talvensaaari-Mattila et al., 2003). Além disso, níveis elevados da MMP-14 (MT1-MMP), fator importante no processo de ativação da MMP-2, estão associados com a detecção de metástase no linfonodo e ocorrência de metástase à distância (Jones et al., 1999; Ueno et al., 1997).

A MMP-9 é altamente expressa em tecido de carcinoma mamário humano. O aumento dos níveis de expressão e atividade da MMP-9 correlacionam com o

aumento do grau do tumor, sendo que níveis elevados de expressão estão associados com tamanho do tumor e detecção de metástases no linfonodo (Iwata et al., 1996).

Altos níveis de expressão protéica da MMP-14, proteína ativadora da MMP-2, (MT1-MMP) correlacionam com presença de metástase no linfonodo (Jones et al., 1999).

1.7. Os TIMPs como inibidores de Metaloproteinases de Matriz

Os inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs) representam uma família de proteínas secretadas, que são 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, -2, -3 e -4. Estes inibidores são expressos por uma variedade de tipos celulares e estão presentes na maioria dos tecidos e fluidos corporais (Brew et al., 2000; Lambert et al., 2004; Visse & Nagase, 2003).

Os TIMPs são proteínas pequenas (21-34 kDa). Eles compartilham 37-51% de homologia na sequência global, apresentam uma estrutura gênica conservada e 12 resíduos conservados de cisteína formando seis pontes dissulfeto que dobram a proteína em dois domínios distintos tanto estrutural quanto funcionalmente (Lambert et al., 2004). O domínio N-terminal se dobra como uma unidade separada que é capaz de inibir a atividade das MMPs (Visse & Nagase, 2003). As interações entre TIMPs e MMPs envolvem múltiplos resíduos presentes no domínio N-terminal (Caterina et al., 1997; Lambert et al., 2004). Estes resíduos interagem com o domínio catalítico da enzima, ou seja, com o sítio de ligação do Zn^{2+} das MMPs ativas (Blavier et al., 1999). O domínio C-terminal é menos conservado entre os TIMPs e liga-se ao domínio hemopexina de diversas pró-MMPs, permitindo a formação de complexos pró-MMP/TIMP (Blavier et al., 1999; Lambert et al., 2004) (Fig. 5).

Figura 5: Domínios estruturais dos TIMPs.
(Adaptado de Lambert et al., 2004).

Apesar de serem capazes de inibir a atividade proteolítica de todas as MMPs testadas até o momento, os TIMPs diferem em muitos aspectos, incluindo solubilidade e capacidade de interação com as pró-enzimas (pró-MMPs) (Lambert et al., 2004). TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 são encontrados na forma solúvel, enquanto que TIMP-3 encontra-se fortemente associado a glicosaminoglicanos sulfatados da matriz, concentrando-se em regiões específicas nos tecidos e na membrana basal (Yu et al., 2000). Os TIMPs ligam-se às MMPs mas também possuem a habilidade de formar complexos com as pró-MMPs. TIMP-1 forma preferencialmente um complexo com a pró-MMP-9, enquanto que TIMP-2 liga-se à pró-MMP-2 (Howard & Banda, 1991; Ward et al., 1991). TIMP-3 liga-se a ambas pró-MMP-2 e pró-MMP-9 (Butler et al., 1999) e TIMP-4 pode se ligar ao domínio C-terminal da pró-MMP-2 (Bigg et al., 1997). TIMP-2 e TIMP-3 são inibidores efetivos das MMPs do tipo membrana (MT-MMPs), enquanto que TIMP-1 inibe fracamente estas enzimas (Bode & Maskos, 2003). Algumas destas propriedades particulares apresentadas pelos diferentes TIMPs estão associadas a diferenças seqüenciais que ocorrem, preferencialmente, nas regiões de *loop* da proteína (Blavier et al., 1999). Além disso, os TIMPs diferem em termos de regulação

da expressão gênica e padrão de expressão tecido-específico. A expressão dos TIMPs é induzida por citocinas, fatores de crescimento, hormônios e retinóides (Wojtowicz-Praga et al., 1997). A expressão gênica do TIMP-1 é regulada durante o desenvolvimento e o remodelamento tecidual, sendo que a expressão do TIMP-2 é constitutiva (Lambert et al., 2004). O padrão de expressão do TIMP-4 é distinto dos outros TIMPs dado que níveis elevados deste transcrito foram observados em cérebro, coração de humano adulto, ovário e músculo esquelético, sugerindo que a proteína TIMP-4 pode ser um importante regulador tecido-específico do remodelamento da MEC (Greene et al., 1996; Lambert et al., 2004).

1.8. Os TIMPs como proteínas multifuncionais no câncer

A ação primária descrita para os TIMPs compreende sua habilidade em manter a homeostase da MEC através da regulação da atividade proteolítica das MMPs, exercendo, assim, um importante papel na destruição tecidual maligna que correlaciona com um desbalanço da atividade das MMPs sobre os TIMPs (Liotta et al., 1991a; Visse & Nagase, 2003).

Altos níveis de MMPs correlacionam com mau prognóstico em diversos tipos de cânceres humanos. Dado que os TIMPs inibem a atividade das MMPs *in vivo*, espera-se que altos níveis de inibidores previnam 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.

Numerosos estudos têm descrito uma ampla variedade de funções para estas moléculas. Os TIMPs, como moléculas multifuncionais, são capazes de suprimir e de promover a progressão tumoral modulando atividades celulares como proliferação, apoptose e angiogênese. Parte destas funções são atribuídas à inibição da atividade

das MMPs, mas os TIMPs também exibem atividades celulares que parecem ser independentes da ação sobre as MMPs (Lambert et al., 2004) (Fig. 6).

Figura 6: Efeitos paradoxais dos TIMPs no comportamento da célula tumoral.

Os TIMPs, atuando como inibidores de MMPs ativas, protegem a MEC da degradação proteolítica prevenindo a invasão e a metástase tumoral (1). Os TIMPs inibem a proliferação celular limitando a biodisponibilidade e a ativação de fatores de crescimento na MEC (2). Os TIMPs bloqueiam a progressão do ciclo celular através da manutenção da integridade da MEC (3). TIMP-2 atua como molécula adaptadora na ativação da pró-MMP-2 na superfície celular (4). Os TIMPs regulam a proliferação celular e a apoptose através da ligação a um receptor putativo associado à célula (5) (Blavier et al., 1999).

1.8.1. Atividade supressora de tumor dos TIMPs

A importância da degradação da MEC durante a progressão do câncer tem sido bem documentada, reforçando o conceito de que os TIMPs atuam como genes supressores de tumor devido à sua capacidade de inibir a atividade das MMPs e ao seu papel de proteção da MEC (Blavier et al., 1999). Tais evidências foram inicialmente obtidas em experimentos nos quais foi demonstrado que os TIMPs são capazes de inibir o desenvolvimento de metástases em modelos animais

experimentais (Alvarez et al., 1990). A atividade inibitória dos TIMPs sobre as MMPs tem sido evidenciada na progressão tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. A inibição da expressão de TIMP-1 e TIMP-2 em células humanas malignas está associada com o aumento da invasividade, enquanto que a super-expressão dos TIMPs inibe não apenas a invasão local mas, também, o crescimento do tumor e a formação de metástases (DeClerck et al., 1992). Numerosos estudos têm mostrado que os efeitos dos TIMPs ocorrem em várias etapas da progressão tumoral, incluindo invasão, metástase, proliferação celular e angiogênese (Henriet et al., 1999).

Além do papel como protetor da destruição tecidual maligna, existem diversos mecanismos que apoiam o efeito anti-tumoral dos TIMPs. Primeiramente, os TIMPs possuem atividade anti-angiogênica, tanto através do efeito direto na proliferação de células endoteliais, quanto através da habilidade de suprimir a atividade das MMPs, a qual é necessária para migração e invasão das células endoteliais. Além disso, através da regulação da atividade das MMPs, os TIMPs podem exercer um importante papel limitando a biodisponibilidade de fatores de crescimento e fatores angiogênicos. Um terceiro mecanismo que sugere a atividade anti-tumoral dos TIMPs é baseada no fato de o remodelamento da MEC controlar funções celulares essenciais, como: crescimento, diferenciação e apoptose. Desta forma, através da manutenção da integridade da MEC, os TIMPs podem manter um controle indireto sobre a proliferação de células malignas (Blavier et al., 1999).

1.8.2. Atividade promotora de tumor dos TIMPs

Evidências experimentais sugerem que os TIMPs podem funcionar de maneira a promover, mais do que suprimir, a progressão tumoral. Os mecanismos que suportam o efeito paradoxal positivo dos TIMPs na progressão tumoral não estão completamente elucidados e têm sido alvo de intensa investigação, a qual tem apontado para uma dupla função para os TIMPs.

Além de inibir a atividade das MMPs, certos TIMPs atuam promovendo o aumento da degradação proteolítica (Blavier et al., 1999). TIMP-2, por exemplo, exerce papel de molécula adaptadora que regula a ativação da pró-MMP-2 na superfície celular. O processamento da pró-MMP-2 ocorre por meio de duas clivagens proteolíticas. Em um primeiro momento, um complexo ternário ancorado à membrana consistindo de MMP-14 (MT1-MMP), TIMP-2 e pró-MMP-2 é formado na superfície celular e a pró-MMP-2 é clivada pela ação de uma segunda molécula de MMP-14 ativa, gerando, assim, a forma intermediária da MMP-2. Em seguida, o domínio residual da forma intermediária é liberado, através de uma clivagem auto-proteolítica, acompanhando a liberação da forma ativa da MMP-2 da membrana. TIMP-2 é capaz de se ligar à pró-MMP-2, via interação C-terminal, e ao sítio ativo da MMP-14, através do seu domínio N-terminal. Esta dupla ligação aproxima a pró-MMP-2 da superfície celular, onde esta pode ser ativada por outras moléculas de MMP-14 (Shofuda et al., 1998). Além disso, através de mecanismos ainda não elucidados, alguns TIMPs podem afetar diretamente funções celulares essenciais, como proliferação e morte celular. TIMP-1 e TIMP-2 são capazes de se ligar, com alta afinidade, à superfície da célula, sugerindo que os TIMPs podem se comportar como fatores de crescimento ou citocinas (Hayakawa et al., 1994; Hayakawa et al., 1992). Estudos prévios demonstraram a presença de sítios de ligação para TIMP-1 e TIMP-2 em diferentes tipos celulares (Luparello et al., 1999). Embora os receptores putativos para os TIMPs ainda não tenham sido caracterizados, existem evidências crescentes de que TIMP-1 e TIMP-2 induzem uma sinalização intracelular (Lambert et al., 2004).

Dadas as funções paradoxais, os fatores que direcionam a atividade dos TIMPs para a supressão ou progressão tumoral ainda não foram identificados. Alguns fatores como a concentração no tecido, a distribuição celular, a associação com pró-MMPs e a presença de receptores putativos parecem ser relevantes.

A atividade promotora de crescimento de TIMP-1 e TIMP-2, *in vitro*, é dependente da concentração do inibidor, sendo esta diferente da concentração na qual o TIMP atua inibindo a degradação da MEC (Hayakawa et al., 1994; Hayakawa et al., 1992). A concentração de TIMP-1 e de TIMP-2 pode ser detectada no soro de pacientes com câncer, no entanto, não existe informação disponível a respeito da concentração desses inibidores nos tecidos tumorais (Fujimoto et al., 1993). Assim, não é possível concluir se a superexpressão dos TIMPs nos tecidos pode ter um efeito estimulatório sobre a proliferação celular *in vivo*. A detecção do inibidor em sua forma livre ou associado com pró-MMPs é um fator importante dado que quando ligado a pró-MMP-2, TIMP-2 favorece a ativação desta enzima na superfície da célula e a degradação da MEC, enquanto que na forma livre este pode interagir com MMPs ativas inibindo a atividade destas enzimas. Além disso, a presença seletiva de um receptor para os TIMPs pode atuar como fator de discriminação entre células que respondem e células que não respondem aos TIMPs (Blavier et al., 1999).

1.9. Valor diagnóstico e terapêutico dos TIMPs no câncer

Considerando-se a complexidade do mecanismo pelo qual os TIMPs podem regular a atividade das MMPs e seu papel como proteína multifuncional, é esperado que a detecção dos níveis de TIMPs não atue como fator preditivo do curso clínico e do risco do desenvolvimento de metástases à distância. Alternativamente, sugere-se a análise do balanço dos níveis de MMPs e de TIMPs como fator prognóstico em diversos tipos de câncer.

Dado seu papel na invasão, metástase e angiogênese tumoral, através da inibição das MMPs, os TIMPs surgiram como um novo grupo de agentes terapêuticos para diversos tipos de tumores, levando ao desenvolvimento de inibidores sintéticos das MMPs. No entanto, estudos utilizando TIMPs recombinantes ou sistemas de transferência gênica não têm demonstrado os resultados esperados, mostrando uma

fraca atividade anti-tumoral. Tal fato pode ser atribuído, em parte, à inibição não-seletiva das MMPs e ao fato de que a inibição das MMPs é provavelmente insuficiente para o tratamento de estádios avançados da doença. Além disso, a redução da progressão tumoral pelos TIMPs não está restrita à inibição das MMPs, envolvendo outros mecanismos sobre os quais os inibidores sintéticos não atuam como, por exemplo, a inibição da angiogênese via inibição direta da proliferação de células endoteliais.

O uso destes compostos na terapia clínica do câncer pode ser efetivo na medida em que sejam desenvolvidos inibidores sintéticos seletivos, capazes de se ligarem a metaloproteinases específicas (Nagase & Brew, 2002; Visse & Nagase, 2003). Além disso, o conhecimento dos mecanismos moleculares que são regulados pelos TIMPs, bem como aqueles que regulam a expressão de TIMPs e MMPs, pode representar uma nova metodologia para o desenvolvimento de terapias potenciais (Lambert et al., 2004).

Um melhor entendimento do papel das MMPs na progressão tumoral e da dupla função dos TIMPs, particularmente nas vias de proliferação e morte celular, será necessário para a determinação do potencial benefício do uso dos TIMPs no tratamento do câncer.

1.10. Os TIMPs no câncer de mama

No câncer de mama, altos níveis de expressão gênica do TIMP-1 foram significativamente associados com metástase no linfonodo, desenvolvimento de metástase à distância e menor tempo de sobrevida (Nakopoulou et al., 2002; Ree et al., 1997). Altos níveis do transcrito de TIMP-1 foram detectados, predominantemente, em áreas de intenso remodelamento tecidual (Lindsay et al., 1997). Além disso, os níveis de expressão protéica de TIMP-1 foram associados com menor tempo de

sobrevida livre de doença e menor tempo de sobrevida global para pacientes com câncer de mama (McCarthy et al., 1999; Schrohl et al., 2003; Schrohl et al., 2004). Os níveis de expressão de TIMP-1 não apresentaram associação significativa com outros marcadores moleculares como, por exemplo, tamanho do tumor, grau de malignidade e *status* de receptores hormonais (Wurtz et al., 2005).

Altos níveis do transcrito do TIMP-2 foram associados com o desenvolvimento de metástase no linfonodo (Ree et al., 1997). Da mesma forma, altos níveis de expressão protéica do TIMP-2 foram significativamente associados com menor tempo de sobrevida livre de doença e menor tempo de sobrevida global para pacientes com câncer de mama (Kuvaja et al., 2005; Remacle et al., 2000; Visscher et al., 1994).

1.11. Os inibidores endógenos das MMPs

Os TIMPs não são os únicos inibidores endógenos das MMPs. A proteína α 2-macroglobulina (750 kDa), produzida pelo fígado e detectável no soro normal, é um importante inibidor da atividade das MMPs (Sternlicht & Werb, 2001). Dado o fato da α 2-macroglobulina ser uma proteína plasmática abundante, ela representa o principal inibidor das MMPs nos fluidos teciduais. Além disso, seu grande tamanho prejudica sua penetração no tecido, limitando sua efetividade como inibidor fora do compartimento intravascular (Wojtowicz-Praga et al., 1997). Dado o fato dos complexos α 2-macroglobulina/MMP serem removidos por endocitose mediada por receptor, a α 2-macroglobulina exerce um importante papel na inativação irreversível das MMPs, enquanto que os TIMPs inibem as MMPs de maneira reversível (Sternlicht & Werb, 2001). Após clivagem por uma proteinase, a α 2-macroglobulina sofre uma mudança conformacional, retraindo a enzima e bloqueando seu acesso a substratos protéicos.

Outra classe de inibidores de MMPs recentemente caracterizados, os subdomínios protéicos, possuem similaridades estruturais com os TIMPs. Por exemplo, o processamento do *procollagen c-terminal proteinase enhancer protein* (PCPE) libera um fragmento com atividade inibitória da MMP-2, que possui similaridade estrutural com o domínio N-terminal dos TIMPs (Mott et al., 2000). Além disso, outras proteínas têm sido descritas como sendo inibidoras de MMPs. O *tissue factor pathway inhibitor-2* (TFPI-2) é um inibidor de serina protease que inibe as MMPs (Herman et al., 2001). A forma secretada da proteína precursora da β -amilóide, também tem sido descrita como sendo inibidora da MMP-2 (Miyazaki et al., 1993). RECK, uma glicoproteína de membrana, inibe a atividade proteolítica de três MMPs (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP). No entanto, os mecanismos da inibição das MMPs por estas proteínas e subdomínios protéicos ainda não é conhecido.

1.12. Gene supressor de metástase RECK

O gene RECK foi inicialmente isolado a partir do rastreamento de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano com o intuito de desvendar alvos moleculares capazes de induzir a reversão fenotípica da linhagem DT, uma sublinhagem de células NIH-3T3 transformadas com o oncogene v-Ki-ras (Noda et al., 1989; Takahashi et al., 1998). O gene RECK humano foi mapeado no cromossomo 9p13, consistindo de 21 exons e 20 introns que recobrem mais de 87kb do genoma humano (Eisenberg et al., 2002).

O cDNA humano codifica uma glicoproteína de membrana composta por 971 resíduos de aminoácidos (110KDa) denominada RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs). A proteína RECK é rica em cisteína e contém regiões hidrofóbicas em ambas as extremidades. A seqüência peptídica da proteína humana madura expressa em células de mamíferos indica que a porção hidrofóbica NH₂-

terminal funciona como um peptídio sinal, enquanto que a porção COOH-terminal parece funcionar como sinal para âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pela qual RECK é ancorada à membrana plasmática. A porção mediana da proteína contém três domínios do tipo inibidor de serina protease (SPI) (Onisto et al., 1995), um dos quais apresentando a sequência consenso denominada de motivo Kazal. Além disso, foram detectadas duas sequências repetidas de fraca homologia com o fator de crescimento epidermal (EGF), motivos de cisteína e cinco sítios com potencial de glicosilação (Takahashi et al., 1998) (Fig. 7).

Figura 7: Organização estrutural da proteína RECK humana.
(Adaptado de Takahashi et al., 1998).

O gene RECK é expresso constitutivamente em diversos tecidos humanos normais, porém, sua expressão é suprimida durante a transformação celular, uma vez que a expressão deste gene é baixa ou não detectável em linhagens celulares derivadas de tumor e em linhagens transformadas por diversos oncogenes, sugerindo que RECK é alvo comum da sinalização oncogênica (Takahashi et al., 1998).

A importância da supressão da expressão de RECK na manifestação do fenótipo maligno foi analisada através da obtenção de transfectantes estáveis. A primeira indicação de que RECK estaria regulando a atividade das MMPs veio da observação de que a expressão constitutiva do gene RECK em linhagens celulares malignas resultou em supressão da atividade invasiva e metastática destas células, acompanhada de concomitante diminuição da secreção da pró-MMP-9 e inibição da liberação da MMP-2 ativa no sobrenadante da cultura (Takahashi et al., 1998).

Relatos recentes mostraram que RECK regula negativamente a atividade proteolítica da MMP-9 e de outras duas MMPs: MMP-2 e MMP-14 (MT1-MMP), cujas atividades estão freqüentemente envolvidas no processo de carcinogênese (Oh et al., 2001); revisto por (Rhee & Coussens, 2002). O restabelecimento da expressão de RECK em células de uma linhagem de fibrossarcoma humano (HT1080) resulta em diminuição da secreção tanto da forma intermediária quanto da forma ativa da MMP-2, sugerindo que RECK regula a ativação da pró-MMP-2 por inibir duas enzimas proteolíticas necessárias para o seu processamento, a MMP-14 (MT1-MMP) e própria MMP-2 ativa (Oh et al., 2001).

O modelo proposto para regulação da atividade das MMPs por RECK é que esta proteína, ancorada à membrana plasmática, estaria mediando a inibição da secreção da pró-MMP-9 e da atividade da MMP-9, a inibição da atividade da MMP-14 (MT1-MMP) sobre seus substratos e na formação do complexo ternário de ativação da MMP-2 e, além disso, inibindo o processamento proteolítico da pró-MMP-2 e a atividade da MMP-2 sobre seus substratos (Rhee & Coussens, 2002; Sasahara et al., 2002; Takahashi et al., 1998) (Fig. 8). Durante o processo de transformação celular, a expressão do gene RECK é inibida, resultando em um desbalanço no controle da atividade das MMPs, promovendo a formação de MMPs ativas, que irão contribuir para a transformação morfológica e o comportamento invasivo de células tumorais. É importante ressaltar que, além das MMPs, outros alvos moleculares da ação de RECK, ainda não identificados, podem estar contribuindo para o fenótipo maligno.

Figura 8: Regulação da atividade das MMPs pelo inibidor associado à membrana, RECK.

(a) A secreção da pró-MMP-9 é bloqueada por RECK. Além disso, RECK é capaz de inibir a atividade catalítica da MMP-9 sobre seus substratos específicos. (b) A forma ativa da MMP-14 (MT1-MMP) é inibida por RECK, limitando o processamento inicial de ativação da pró-MMP-2 no complexo ternário contendo MMP-14 e TIMP-2. (c) RECK inibe a atividade catalítica da MMP-2 ativa, bem como a etapa de auto-processamento na ativação da pró-MMP-2 (Adaptado de Rhee et al., 2002).

As funções biológicas de RECK *in vivo* foram exploradas, recentemente, através de experimentos utilizando camundongos que sofreram *knock-out* gênico e ensaios de tumorigenicidade em camundongos *nude*. Camundongos nos quais a proteína RECK está ausente morrem em torno do décimo dia do desenvolvimento

embrionário, com deficiências na formação e na integridade de fibras de colágeno, desorganização da lâmina basal e comprometimento do desenvolvimento vascular. Este fenótipo foi parcialmente suprimido pelo *knock-out* do gene correspondente à MMP-2, indicando que a regulação da atividade da MMP-2 mediada por RECK tem um papel fisiológico (Oh et al., 2001).

Ensaio de tumorigenicidade em camundongos *nude* sugerem que RECK inibe a angiogênese tumoral, uma vez que as ramificações vasculares foram drasticamente suprimidas nos tumores gerados a partir de células de fibrossarcoma que expressavam RECK constitutivamente. Além disso, os camundongos que desenvolveram estes tumores apresentaram maior sobrevida quando comparados àqueles que desenvolveram o tumor controle, gerado a partir de células que apresentavam ausência da expressão constitutiva de RECK (Oh et al., 2001).

Recentemente, diversos trabalhos têm sido realizados no sentido de analisar a expressão do gene RECK em tumores humanos, correlacionando esta observação com a progressão maligna e o prognóstico dos pacientes. A expressão do gene RECK foi detectada em uma variedade de tipos de tumores como hepatocarcinoma (Furumoto et al., 2001), carcinoma de mama (Span et al., 2003), carcinoma de pâncreas (Masui et al., 2003), carcinoma de células não pequenas de pulmão (Takenaka et al., 2004; Takenaka et al., 2005) e carcinoma colorretal (Takeuchi et al., 2004; van der Jagt et al., 2005). Níveis elevados de expressão gênica de RECK nestes tumores correlacionaram com um prognóstico favorável para os pacientes promovendo um maior tempo de sobrevida global (Furumoto et al., 2001; Masui et al., 2003; Takenaka et al., 2004; Takenaka et al., 2005; van der Jagt et al., 2005) maior tempo de sobrevida livre de recorrência (Span et al., 2003; Takeuchi et al., 2004), menor invasividade do tumor (Masui et al., 2003) e diminuição da angiogênese tumoral (Takenaka et al., 2004; Takeuchi et al., 2004).

2. OBJETIVO GERAL

Considerando-se: a necessidade da descoberta de novos marcadores moleculares visando um estadiamento mais apurado dos tumores de mama e o desenvolvimento de terapias alvo-específicas; a importância do estudo da metástase, principal fator determinante da sobrevida das pacientes com câncer de mama, e o papel chave das MMPs e de seus inibidores no processo de invasão e metástase do câncer de mama, o objetivo do presente estudo consiste em:

Avaliar a participação de membros da família das metaloproteinases de matriz (MMPs), de membros da família dos inibidores teciduais das MMPs, os TIMPs, e do inibidor de MMPs associado à membrana RECK, na progressão tumoral do câncer de mama humano através do estudo do padrão de expressão destes genes e da atividade enzimática das MMPs em linhagens celulares tumorais de mama que apresentam diferenças na capacidade invasiva e na propensão à metástase e em amostras de tumores primários e de bordas normais adjacentes ao tumor, provenientes de pacientes com câncer de mama. Propõe-se também avaliar o papel da interação célula-matriz extracelular na regulação da expressão destes genes através do cultivo das linhagens celulares em plástico revestido com MATRIGEL™, dado que células de carcinoma invasivo estão em contato com a MEC durante o processo de invasão celular *in vivo*.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o potencial invasivo, metastático e proliferativo de linhagens celulares de câncer de mama humano previamente estabelecidas.
- Analisar os níveis de expressão e a atividade proteolítica das MMPs envolvidas no processo de invasão de carcinomas de mama e que são reguladas negativamente por RECK, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP), em linhagens de carcinoma mamário humano.
- Analisar os níveis de expressão dos inibidores teciduais das MMPs, TIMP-1 e TIMP-2, e do inibidor da atividade de MMPs associado à membrana, RECK, em linhagens de carcinoma de mama humano.
- Analisar os níveis de expressão dos genes acima mencionados em amostras de tumores primários de mama e de borda normal adjacente.
- Analisar os níveis de expressão protéica do inibidor da atividade de MMPs associado à membrana, RECK, em amostras de carcinomas primários de mama através da técnica de *Tissue Microarray*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Plasmídeos

pSK-hRECKcDNA: plasmídeo pBluescript SK (+) contendo o cDNA completo de RECK humano (hRECK) (Takahashi et al., 1998), gentilmente cedido pelo Prof. Makoto Noda (Universidade de Kyoto, Japão).

pGEM-36B4cDNA: plasmídeo pGEM contendo o cDNA de humano correspondente ao gene 36B4 que codifica para a fosfoproteína ribossomal ácida (Laborda, 1991), gentilmente cedido pelo Prof. Makoto Noda (Universidade de Kyoto, Japão).

4.2. Linhagens celulares

MCF-7: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano (ATCC, HTB-22) proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 69 anos (Soule et al., 1973).

ZR-75-1: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano proveniente da ATCC (CRL-1500). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 63 anos (Engel et al., 1978).

MDA-MB-435: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano (ATCC, HTB-129) gentilmente cedida pela Profa. Anamaria Camargo (Instituto Ludwig, Brasil). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 31 anos (Cailleau et al., 1978).

MDA-MB-231: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano (ATCC, HTB-26) gentilmente cedida pela Profa. Maria Aparecida Nagai (Faculdade de Medicina, USP). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 51 anos (Cailleau et al., 1978).

Hs578T: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano proveniente da ATCC (HTB-126). A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 74 anos (Hackett et al., 1977).

NIH-3T3: fibroblasto de embrião de camundongo Swiss do NIH (Jainchill et al., 1969).

4.3. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos

Meios de cultura:

DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”) (Gibco).

RPMI (desenvolvido no “Roswell Park Memorial Institute”) (Gibco).

Soro fetal bovino: SFB (Cultilab Materiais para Cultura de Células)

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

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

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

4.4. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, segundo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989).

4.5. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As linhagens de carcinoma mamário humano foram cultivadas a temperatura de 37°C em frascos plásticos descartáveis em atmosfera de 2% CO₂/98% ar, para a manutenção do pH próximo ao fisiológico. As diferentes linhagens foram mantidas em meio de cultura específico suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, 25 mg/l de ampicilina e 100mg/l de estreptomicina. Ao atingirem, aproximadamente, 80% da densidade de saturação as culturas celulares foram lavadas com PBSA e subcultivadas utilizando solução de tripsina. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido estéril) a -190 °C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

As células das linhagens de carcinoma mamário utilizadas neste estudo foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma hominis* (Kit Mycoplasma IST – Biomerieux – Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein).

4.6. Manutenção das linhagens celulares em diferentes substratos

A caracterização morfológica das linhagens de carcinoma mamário humano foi realizada em diferentes tipos de substrato: plástico sem revestimento e plástico revestido com elementos de matriz extracelular na forma de membrana basal reconstituível (MATRIGEL™), de forma a gerar um ambiente biomimético. O revestimento das placas com MATRIGEL™ foi realizado na forma de gel de fina espessura (aproximadamente 285µg de MATRIGEL™/cm² da placa), condição na qual as células aderem e proliferam sobre a camada de complexo protéico, e na forma

de gel espesso (aproximadamente 750 μ g de MATRIGEL™/cm² da placa), condição na qual as células são capazes de aderir e proliferar embebidas numa matriz tridimensional. As linhagens foram mantidas sob estas condições por diferentes períodos de tempo e fotografadas em microscópio invertido (Nikon Diaphot, modelo Eclipse TE 300).

4.7. Ensaio de curva de crescimento celular em substrato sólido

5x10³ células/cm² das linhagens de carcinoma mamário analisadas foram plaqueadas em meio de cultura suplementado com 10% soro sobre placas de 24 poços, revestidas, ou não, com camada de fina espessura de membrana basal reconstituível (MATRIGEL™, aproximadamente 285 μ g/cm²). As placas foram mantidas em condições adequadas de cultura, sendo o meio renovado a cada dois dias. Triplicatas das culturas de cada linhagem celular foram coletadas nos dias 1, 3, 5, 7, e 9 após o plaqueamento.

A coleta em substrato plástico foi realizada através da lavagem das placas com PBSA e adição de 0,4ml de solução de tripsina e 0,5 ml de PBSA. As células plaqueadas sobre plástico revestido com MATRIGEL™ foram coletadas através da adição de 0,1ml de solução de tripsina e 0,8 ml de solução Versene e fixadas adicionando-se 0,1ml de formaldeído 37%. As células fixadas foram mantidas a 4°C até o momento da contagem.

A contagem das suspensões de células foi realizada em contador eletrônico (CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, modelo CC530), através de diluições apropriadas em solução salina (NaCl 0,9%; Azida de Sódio 0,02%), feitas com auxílio de diluidor variável (CELM, modelo DV-250). Nos dias de coleta as culturas foram fotografadas em microscópio invertido (Nikon Diaphot, modelo Eclipse TE 300).

4.8. Ensaio de invasão celular *in vitro*

O potencial invasivo das linhagens celulares de carcinoma mamário humano foi analisado através de ensaios de invasão *in vitro* em placas do tipo "Transwell®" (Corning) utilizando membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) como substrato para invasão. Foram utilizadas placas de 12 poços contendo insertos de membrana de polycarbonato porosa de 12mm de diâmetro com poros de 12µm. As células foram carenciadas para soro (meio sem soro contendo BSA 0,1% (Sigma)) por, aproximadamente, 12h. 1×10^5 células em 500µl de meio de cultura para carenciamento de soro foram plaqueadas sobre as membranas porosas, as quais foram revestidas, ou não, com MATRIGEL™ (aproximadamente 400µg/cm²), para analisarmos a taxa de invasão e a taxa de migração celular, respectivamente. No compartimento inferior de cada poço foram adicionados 700µl de meio de cultura contendo alta concentração de soro (10%), quimioatrativo para migração/invasão das células através dos poros das membranas.

Após 24h, os insertos foram lavados 5 vezes em PBSA e as células foram fixadas em solução formaldeído 3,7% em PBSA por 30 min a temperatura ambiente. Após o processo de fixação, os insertos foram lavados 5 vezes em água Milli-Q® e as células foram coradas em solução azul de toluidina 1% em borax 1% (Borato de Sódio Hidratado). O excesso de corante foi removido lavando-se os insertos aproximadamente 20 vezes em água Milli-Q®. As células que não atravessaram a membrana porosa, bem como a camada de complexo protéico (MATRIGEL™), foram removidas com auxílio de hastes flexíveis de algodão (Cotonete®). Após secagem, as membranas foram fotografadas em microscópio invertido (Nikon Diaphot, modelo Eclipse TE 300).

4.9. Ensaio de formação de colônia em meio semi-sólido

A tumorigenicidade e o potencial metastático das linhagens de câncer de mama utilizadas foram determinados através de ensaios de crescimento em suspensão de agarose (Agarose Medium EEO, Fisher). Os poços de placas de 24 poços foram preenchidos com 500µl de agarose 0,6% em meio de cultura específico/10% SFB. Sobre esta camada, foram plaqueados 100µl de meio de cultura contendo células isoladas diluídas nas concentrações de 10^5 e 10^4 células/ml em meio de cultura, em duplicata. Rapidamente, para evitar a adesão das células, foram adicionados 500µl de solução semi-sólida de agarose 0,3% ou 0,9% em meio de cultura específico/10% SFB. Após 24h, foram adicionados 500µl de meio de cultura específico/10% SFB sendo que esta camada superior de meio líquido foi trocada a cada 3 dias. Trinta dias após o plaqueamento, as colônias foram fixadas com a adição de 100µl de formaldeído 37%, fotografadas em microscópio invertido (Nikon Diaphot, modelo Eclipse TE 300) e contadas com auxílio de microscópio invertido, em aumento de 100x.

4.10. Ensaio de metástase experimental em camundongo *nude*

Camundongos fêmeas imunodeficientes do tipo *nude*, apresentando de 8 a 14 semanas de idade, foram obtidos no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF-IQ/USP), onde foram mantidos e manipulados. 1×10^6 células de carcinoma mamário humano isoladas e em suspensão em 100µl de PBSA, foram injetadas na veia lateral da cauda dos camundongos. 45 dias após a injeção, os animais foram sacrificados e examinados quanto ao número de colônias superficiais detectadas no pulmão. Os pulmões coletados foram, então, fixados em solução de

formaldeído 3,7% em PBSA por, aproximadamente, 12h a temperatura ambiente, e mantidos em solução etanol 70% para posterior registro fotográfico.

Toda a metodologia aplicada para o estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Anima (CECUA) do IQ-USP.

4.11. Ensaio de atividade enzimática – Zimograma (Heussen & Dowdle, 1980)

A atividade gelatinolítica das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 foi detectada através de ensaios de Zimografia. 5×10^4 células/cm² foram plaqueadas em placas de 24 poços em plástico sem revestimento e em plástico revestido com uma camada de fina espessura de MATRIGEL™, e mantidas em alta concentração de soro (10% soro). 48h após o plaqueamento, as células foram carenciadas para soro (meio sem soro contendo BSA 0,1% (Sigma)) durante, aproximadamente, 12h. O meio condicionado das células foi submetido à dosagem de proteínas utilizando-se um kit comercial (Protein Assay, BioRad) baseado no método de Bradford (Bradford, 1976). Alíquotas de meio condicionado de cada uma das condições, contendo 25 µg de proteína, foram aquecidas a 50°C por 10seg em tampão de amostra não redutor 1x (Tris-HCl 150 mM pH 6,8; SDS 6%; Glicerol 30%; Azul de bromofenol 0,3%). O fracionamento das amostras foi realizado em condições desnaturantes e não redutoras em gel poliacrilamida 12% - SDS, de 1,5mm de espessura contendo Gelatina 0,1% (Bio Rad), em tampão de corrida 1x (Tris-HCl 250mM; Glicina 2,5M; SDS 1%). A gelatina é co-polimerizada com a acrilamida atuando como substrato da atividade proteolítica das gelatinases. Após a corrida (15-20mA por, aproximadamente, 12h), o gel foi lavado duas vezes em solução Triton X-100 2% por 15min à 37°C para remoção do SDS e, então, incubado por 16-20h na mesma

temperatura em tampão de incubação contendo Ca^{2+} e Zn^{2+} , cofatores das MMPs a serem analisadas (Tris-HCl 50mM pH7,4; CaCl_2 10mM; ZnCl_2 5 μM). Após a incubação, o gel de poliacrilamida foi corado por 30 min em solução de coloração por Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) 0,5%; Metanol 30%; Ácido acético glacial 10%) e, após este período, descorado com lavagens sucessivas em solução descorante (Metanol 30%; Ácido acético glacial 10%). O corante utilizado cora a matriz do gel que contém gelatina, a qual atua como substrato para as proteases, portanto, as bandas observadas representam regiões de digestão, ou seja, sítios de atividade das proteases. O gel corado foi digitalizado em *scanner* de mesa de braço duplo (UMAX UTA 1100 Transparency Adapter, Hewlett Packard, GE Healthcare) gerando imagens digitalizadas.

4.12. Extração e purificação de RNA total de células de mamíferos

1×10^4 células/cm² foram plaqueadas, nos diferentes substratos, plástico sem revestimento e plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™ (aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em placas P100. Após 3 ou 5 dias em cultura as células foram lisadas em solução de lise (Tiocianato de guanidina 4M; Citrato de Sódio 25mM pH7,0; β -mercaptoetanol 0,1M). Os lisados foram transferidos para tubos de polialômero contendo solução de cloreto de cério (Cloreto de Cério 5,7M; Acetato de Sódio 25mM pH5,0) e submetidos à ultracentrifugação a 37.000 rpm em rotor SW 50.1, a 20°C por, aproximadamente, 18h em ultracentrífuga (Beckman L8-80M, Beckman Instruments)(Chirgwin et al., 1979). O RNA, sedimentado no fundo dos tubos, foi ressuspensionado em volume adequado de água Milli-Q®. A concentração do RNA foi determinada pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando-se como valor padrão $1_{\text{Abs}260\text{nm}} = 40\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNA. O grau de pureza da preparação foi estimado pela relação $\text{Abs}260\text{nm}/\text{Abs}280\text{nm}$, considerando-se, como pureza

satisfatória, uma relação próxima de 2,0. Além disso, a qualidade do RNA foi avaliada através da análise dos RNAs ribossomais fracionados em gel de agarose contendo tiocianato de guanidina 20mM.

4.13. Ensaio de Northern Blot

4.13.1. Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído (Thomas, 1980) e transferência para membrana de nylon

Alíquotas de 20µg de RNA total extraído conforme descrito no 4.12 foram desnaturadas a 65°C por 10min, em solução de formaldeído 2,2M e formamida 50% em tampão MOPS 1x (Acetato de Sódio tri-hidratado 50mM; EDTA 5mM pH8,0; MOPS 200mM) contendo brometo de etídeo; e, logo em seguida, transferidas para o gelo a fim de impedir a formação de estruturas secundárias. Os RNAs foram fracionados em gel contendo agarose 1,2% e formaldeído 2,2M, em tampão MOPS 1x, sob voltagem constante (70 Volts) por, aproximadamente, 4h. Após eletroforese, o gel foi observado sob luz ultravioleta em transluminador para análise da qualidade do RNA. O gel foi, então, lavado pelo menos quatro vezes em água Milli-Q®, sob agitação branda, por 10min para remoção do excesso de formaldeído e mantido em SSC 20x (NaCl 3M; Citrato Trissódico dihidratado 300 mM, pH 7,0) por 20min. O RNA fracionado foi transferido, por capilaridade, para membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare), em SSC 20x por, aproximadamente, 18h. A eficiência da transferência foi verificada em transluminador UV. Os RNAs fracionados foram fixados incubando-se a membrana a 80 °C por 2h.

4.13.2. Marcação de sonda radioativa

A sonda correspondente ao transcrito de RECK foi preparada a partir do fragmento de 1,5Kb obtido por digestão do plasmídeo pSK-hRECKcDNA com as enzimas de restrição *SacI* e *SacII*. A sonda correspondente ao gene de expressão constitutiva da fosfoproteína ribossomal ácida (36B4, controle interno da quantidade total de RNA aplicada) foi preparada a partir do fragmento de 0,8Kb do cDNA obtido por digestão do plasmídeo pGEM-36B4cDNA com a enzima de restrição *PstI*.

As sondas foram marcadas com [α - 32 P] dCTP (3000 Ci/mmol, GE Healthcare) utilizando o kit *Ready-To-Go DNA Labelling Beads kit (-dCTP)* (GE Healthcare), baseado na reação de *Random Primer Extension* (Feinberg & Vogelstein, 1984). Neste kit, aproximadamente 45 μ l de solução contendo 50ng do fragmento de DNA a ser marcado foram desnaturados e usados para ressuspender *beads*. As *beads* contêm todos os componentes necessários para a reação de marcação (dATP, dGTP, dTTP, 4-8 unidades da enzima *Klenow* e oligonucleotídeos randômicos de 9-mers), menos o nucleotídeo marcado com 32 P, o qual é adicionado em seguida (50 μ Ci). Durante a incubação a 37°C, os *primers* anelam em sítios randômicos no DNA, permitindo que a enzima *Klenow* sintetize as fitas complementares incorporando o nucleotídeo marcado durante o processo.

A sonda radioativa foi purificada dos nucleotídeos livres em colunas de Sephacryl S-300 HR (Kit MicroSpin Column, GE Healthcare) e desnaturada em água fervente por 5min antes de ser usada para a hibridização.

4.13.3. Hibridização molecular radioativa e lavagem dos filtros

Na hibridização radioativa das membranas foi utilizada a solução *ExpressHyb Hybridization Solution™* (BD Biosciences), sendo a membrana pré-hibridizada nesta solução por, no mínimo, 2h a 68°C. A seguir, a membrana foi hibridizada por cerca de 16h a 68°C na mesma solução, adicionada de DNA de esperma de salmão (100µg/ml) e sonda radioativa (valor mínimo de 5×10^5 cpm/ml de solução) previamente desnaturados.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem primário (SSC 2x; SDS 0,1%) a temperatura ambiente por 10min, e duas vezes em tampão de lavagem secundário (SSC 0,2x; SDS 0,1%), a 56°C por 20min.

4.13.4. Autoradiografia

A detecção do sinal radioativo foi realizada através da sensibilização de uma tela de exposição composta por sal complexo de európio (Molecular Dynamics, GE Healthcare). Estas telas são sensíveis a emissões radioativas, que são armazenadas na forma de moléculas de fosfato excitadas. Após a sensibilização, o rastreamento da tela foi realizado em aparelho de Scanner Storm™ PhosphorImager (Molecular Dynamics, GE Healthcare).

4.14. Ensaio de Real Time PCR

4.14.1. Síntese da primeira fita do cDNA

Amostras de RNA total extraído conforme descrito no item 4.12 foram utilizadas como *template* para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa. Aliquotas de 1µg de RNA total, provenientes das linhagens celulares ou das amostras teciduais, foram submetidas a tratamento prévio 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 (Invitrogen) e 0,5µl de RNase OUT™ (40U/µl, Invitrogen) em volume final de 10µl. O tratamento ocorreu através de incubação de 10min a 37°C. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada a 75°C por 10min. Para cada amostra de RNA previamente tratado foram preparadas reações contendo 0,5µl de Oligo dT (0,5µg/µl, Invitrogen), 0,5µl de *Random Primer* (100ng/µl, Invitrogen) e 1µl de dNTP (10mM, Invitrogen) para um volume final de 12µl. As amostras foram incubadas a 75°C por 10min para desnaturação das moléculas e, em seguida, adicionou-se 7µl de uma solução contendo 2µl de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Invitrogen), 2µl de DTT (0,1M, Invitrogen), 0,5µl de RNase OUT™ (40U/µl, Invitrogen) e 2,5µl de água Milli-Q® para um volume final de 19µl. Houve uma nova incubação de 25°C por 10min, para anelamento dos primers, 42°C por 2min e, então, foi adicionado 1µl da enzima SuperScript™ III (200U/µl, Invitrogen). A reação de transcrição reversa ocorreu durante incubação a 42°C por 2h e, em seguida, inativada a 72°C por 10min. Visando degradar o RNA, foi adicionado 1µl de RNase H (5U/µl, Fermentas) em cada tubo e os tubos foram incubados a 37°C por 30min, seguidos de uma incubação a 72°C por 10min para inativação da enzima. Posteriormente, as amostras, em volume final de 20µl, foram diluídas 3x em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

4.14.2. Controle da qualidade do cDNA

Para confirmar a qualidade do cDNA sintetizado, foram realizadas reações de PCR utilizando-se par de *primers* específicos para o gene de expressão constitutiva gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (*Forward* 5'CTGCACCACCAACTGCTTA; *Reverse* 5'CATGACGGCAGGTCAGGTC) e, como *template*, os cDNAs sintetizados conforme descrito no item anterior. Cada reação foi

montada de forma que apresentasse uma concentração final de 1x para o tampão de reação da enzima Taq (Fermentas), 1,5mM de $MgCl_2$ (Fermentas), 0,2mM de dNTP (10mM, Invitrogen), 0,2 μ M de cada um dos *primers* (*Forward* e *Reverse*), 0,5U da enzima Taq DNA Polimerase (5U/ μ l, Fermentas) e cDNA *template*.

O programa utilizado nas reações foi de 94°C por 2min, 35 ciclos de 94°C por 30seg, 56°C por 30seg e 72°C por 45seg e, após os ciclos, 72°C por 6min. As reações foram posteriormente analisadas em gel agarose 1% contendo brometo de etídeo.

4.14.3. Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes nos experimentos de *Real-Time PCR* foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primer Express* versão 2.0 (Applied Biosystems). As principais características dos oligos desenhados pelo programa são: amplificar fragmentos cujo tamanho varie entre 50-150bp, apresentar quantidade de CG entre 30 e 80%, não possuir a capacidade de formação de dímeros ou de estrutura secundária, apresentar temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C de acordo com o algoritmo *nearest neighbor* (Breslauer et al., 1986). Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, os pares de *primers* foram desenhados em exons diferentes do gene (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de *Real-Time PCR*.

GENE	SEQUÊNCIA DO OLIGONUCLEOTÍDEO
<i>MMP-2</i>	F: AGCTCCCGGAAAAGATTGATG R: CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT
<i>MMP-9</i>	F: CCTGGAGACCTGAGAACCAATC R: GATTTGACTCTCCACGCATCT
<i>MMP-14</i>	F: GCAGAAGTTTACGGCTTGCA R: TCGAACATTGGCCTTGATCTC
<i>TIMP-1</i>	F: CCGCAGCGAGGAGTTTCTC R: GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA
<i>TIMP-2</i>	F: CGA CAT TTA TGG CAA CCC TAT CA R: GGG CCG TGT AGA TAA ACT CTA TAT CC
<i>RECK</i>	F: TGCAAGCAGGCATCTTCAAA R: ACCGAGCCCATTTCATTTCTG
<i>GAPDH</i>	F: ACCCACTCCTCCACCTTTGA R: CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<i>TUBULINA</i>	F: TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG R: AGTGCCAGTGCGAACTTCATC
β ACTINA	F: GGCACCCAGCACAATGAAG R: CCGATCCACACGGAGTACTTG
<i>HPRT</i>	F: GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A R: TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT

As sequências estão representadas na direção 5' $\rightarrow$ 3'. Os oligonucleotídeos foram desenhados em exons diferentes do gene a fim de evitar co-amplificação a partir de DNA genômico contaminante. Os amplicons gerados apresentam um tamanho médio de 100pb. F, Forward; R, Reverse.

4.14.4. Reação de *Real-Time PCR*

Para a quantificação do produto formado durante a reação de *Real-Time PCR* foi utilizado o reagente SYBR® Green Dye (Applied Biosystems). O corante SYBER®Green possui afinidade pela *minor groove* da dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520nm, entretanto, quando se liga à dupla fita de DNA, a fluorescência aumenta cerca de 100 x, permitindo então a detecção do produto do PCR em tempo real. O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa computacional GeneAmp 5700 (Applied Biosystems).

Todas as reações de *Real-Time PCR* foram realizadas em duplicata. Como *template*, foram utilizados 3 μ l do cDNA sintetizado anteriormente, diluído 30x em TE, 3 μ l do conjunto de *primers* na concentração final previamente determinada e 6 μ l do reagente SYBER®Green Dye.

Todas as amplificações utilizando cDNAs das linhagens celulares como *template* foram realizadas no termociclador GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Experimentos nos quais cDNAs provenientes de amostras teciduais foram utilizados como *template* foram realizados em termociclador ABI Prism® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 min (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase, AmpEraser), 95°C por 10 min (etapa de ativação da enzima DNA Polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C de 15 seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 min (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do amplicon).

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. O corante SYBR® intercala inespecificamente em DNA dupla-fita. Assim, a presença de amplificação inespecífica e contaminações, além da formação de dímeros de *primers*, poderiam interferir na intensidade de fluorescência medida pelo aparelho. Para avaliar a especificidade das reações de amplificação e detectar a presença de eventual contaminação, uma reação de dissociação do produto amplificado é realizada ao término de cada reação. A temperatura da amostra é elevada gradativamente e a intensidade da fluorescência é medida. 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. A partir dos dados

de fluorescência uma curva de dissociação do produto é gerada. Como produtos de diferentes tamanhos e composição de bases apresentam diferentes TMs, esta curva possibilita a distinção entre diferentes produtos amplificados na reação, a presença de amplificação no controle negativo e a formação de dímeros de *primers*.

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

Em experimentos de *Real-Time PCR*, deve-se considerar a possibilidade da variação da concentração inicial de cDNA na análise dos dados provenientes de duas ou mais amostras. Desta forma, para que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam previamente normalizados. Assim, para cada amostra de cDNA analisada foram realizadas duas reações, 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.

4.14.4.1. Determinação da concentração final de *primers*

Reações contendo primers variando entre uma concentração final máxima de 800nM e mínima de 100nM foram realizadas utilizando-se como *template* uma mistura de cDNAs provenientes de diferentes linhagens de carcinoma mamário humano. Desta forma, foi possível determinar a menor concentração final de *primers* que resultou em uma formação de dímeros mínima, ou inexistente, sem que houvesse variação no valor do Ct e no perfil da curva de amplificação do gene em relação às maiores concentrações analisadas.

4.14.4.2. 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 logaritmo 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:

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

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

4.14.4.3. Confirmação da expressão diferencial

De posse dos Cts, inicialmente foi calculada a média dos Cts das duplicatas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação a 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. Essa 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:

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

4.15. Amostras teciduais de carcinoma mamário humano

Amostras de carcinoma mamário humano de diferentes estádios clínicos (segundo o sistema de Classificação TNM dos tumores malignos da União Internacional contra o Câncer, 2004) e amostras de tecido normal adjacente ao tumor foram coletados após intervenção cirúrgica e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As 40 amostras teciduais provenientes do Banco de Tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo (fornecidos pelo Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, coordenado pela Profa. Dra. Anamaria Camargo – Instituto Ludwig) foram mantidas à -70°C e as 62 amostras, sendo 32 amostras tumorais e 30 amostras de borda normal adjacente, provenientes do Hospital do Câncer Alfredo Abrão - MS (fornecidos pelo Laboratório de Ginecologia Molecular coordenado pelo Prof. Dr. Ismael Guerreiro da Silva – UNIFESP) foram mantidos à -70°C em solução RNA/later™ (Ambion) para posterior obtenção do RNA total. O Termo de Consentimento de doação, seguindo as normas institucionais dos hospitais envolvidos, foi obtido de todos os pacientes.

Os tecidos obtidos foram macerados manualmente em cadinho de porcelana na presença de nitrogênio líquido e, posteriormente, submetidos aos procedimentos de extração e purificação de RNA total conforme descrito no item 4.12.

4.15.1. Obtenção dos dados clínico-patológicos

O levantamento dos dados clínico-patológicos referentes às pacientes do Hospital do Câncer A.C. Camargo foi realizado através da análise dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do hospital.

O levantamento dos dados clínico-patológicos referentes às pacientes do Hospital do Câncer Alfredo Abrão foi realizado através da análise dos laudos provenientes de Laboratórios terceirizados, fornecidos pelo Dr. Adalberto Abrão Siufi.

4.16. *Tissue array*

Para o ensaio de *Tissue Array* foram avaliados um total de 236 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, sendo que as amostras incluídas nas lâminas não coincidem com as amostras avaliadas nos ensaios de *Real-Time PCR*. A seleção dos blocos, a montagem e leitura das lâminas e a análise dos resultados foi realizada pelo grupo de patologia do Laboratório de Anatomia Patológica coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Augusto Soares. Todos os casos incluídos nas lâminas foram revistos através de coloração com hematoxilina-eosina para confirmação do diagnóstico. As lâminas foram submetidas a ensaio de imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-hRECK (MBL – Medical & Biological Laboratories). Em cada lâmina foi incluída uma amostra de cada um dos 236 casos a serem avaliados, sendo que um total de seis lâminas não consecutivas foram submetidas à avaliação imunohistoquímica. 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.

4.17. Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas realizadas 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 e análise de variância com teste *a posteriori* de Tuckey-Kramer para comparações múltiplas. Testes de correlação de Pearson foram aplicados nas análises de correlação. 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 teste estatístico de Logrank. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA HUMANO PREVIAMENTE ESTABELECIDAS

Seleção e cultivo das linhagens celulares de carcinoma mamário humano

Para o desenvolvimento deste estudo, foram selecionadas cinco linhagens celulares de carcinoma mamário humano tendo como base dados de potencial invasivo e propensão à metástase previamente descritos. Optou-se por um painel de linhagens que inclui desde uma linhagem celular de baixa capacidade invasiva e não metastática até uma linhagem celular altamente invasiva com propensão à metástase (Tabela 2).

As linhagens celulares utilizadas foram isoladas de sítios metastáticos de carcinoma ductal invasivo de mama, com exceção da linhagem Hs578T, que foi isolada a partir de um carcinosarcoma primário de mama. O *status* dos receptores de estrógeno e progesterona difere entre as linhagens selecionadas (Tabela 2). Todas as linhagens celulares apresentaram resultado negativo quanto à presença de *Mycoplasma hominis*.

Tabela 2: Aspectos gerais das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas.

Linhagem celular	Tipo histológico	Origem	RE	RP	Potencial invasivo ^a	Potencial metastático ^b	Vimentina
MCF-7	Carcinoma ductal invasivo	Metástase (efusão pleural)	+	+	+	—	-
ZR-75-1	Carcinoma ductal invasivo	Metástase (ascite)	+	+	++	—	-
MDA-MB-435	Carcinoma ductal invasivo	Metástase (efusão pleural)	-	-	+++	++++	+
MDA-MB-231	Carcinoma ductal invasivo	Metástase (efusão pleural)	-	-	++++	+	+
Hs578T	Carcinosarcoma	Tumor primário	-	-	++++	++++	+

Tabela baseada em dados publicados anteriormente (Bae et al., 1993; Price et al., 1990; Thompson et al., 1992).

RE: status do receptor de estrógeno; **RP:** status do receptor de progesterona; Expressão gênica do filamento intermediário de vimentina, marcador de fenótipo mesenquimal, detectado em ensaios de Northern Blot (Negativo (-), Positivo (+)).

^a Potencial invasivo analisado em ensaios de quimioinvasão através de membrana basal reconstituível, MATRIGEL™, em placas do tipo Transwell®.

^b Potencial metastático verificado através de ensaios de metástase espontânea em camundongo imunodeficiente do tipo nude.

Caracterização morfológica das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas

A caracterização morfológica das linhagens celulares foi realizada em diferentes tipos de substrato: plástico sem revestimento e plástico revestido com elementos de matriz extracelular (MEC) na forma de membrana basal reconstituível (MATRIGEL™), de forma a gerar um ambiente biomimético. O plaqueamento das células sobre membrana basal reconstituível é de extrema importância para caracterização das linhagens *in vitro* dado que células de carcinomas invasivos estão em contato com a membrana basal *in vivo*. O revestimento das placas com uma fina camada de MATRIGEL™ forneceu o suporte protéico para adesão e proliferação das células enquanto que o revestimento com gel espesso favoreceu a proliferação em matriz tridimensional.

Podemos observar que as linhagens celulares MCF-7 e ZR-75-1, quando cultivadas em substrato plástico não revestido, apresentaram características morfológicas de epitélio luminal mamário diferenciado, crescendo na forma de colônias interconectadas de células poligonais. Quando cultivadas sobre o mesmo substrato, as linhagens celulares MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T apresentaram fenótipo menos diferenciado, caracterizado por células com morfologia mais próxima da fibroblastóide do que da epitelióide (Fig. 9).

As características morfológicas das células mantidas em substrato plástico demonstraram uma correlação positiva com suas capacidades de invasão e de propensão à metástase. As linhagens celulares de fenótipo fibroblastóide corresponderam àquelas previamente descritas como sendo de maior potencial invasivo e metastático em relação às linhagens celulares de fenótipo epitelióide.

Quando plaqueadas em plástico revestido com MATRIGEL™, as linhagens celulares analisadas apresentaram alterações morfológicas drásticas. As linhagens celulares de carcinoma mamário MCF-7 e ZR-75-1, quando plaqueadas sobre

camada de MATRIGEL™ de fina espessura adquiriram morfologia de célula em processo migratório, evidenciado pela observação de prolongamentos celulares além de células mais dispersas, quando comparadas com os agrupamentos celulares observados na condição sem revestimento. Quando as mesmas linhagens foram submetidas ao crescimento em matriz tridimensional, ou seja, MATRIGEL™ na forma de gel espesso, pudemos observar a formação de colônias nas quais os limites celulares não são visualizados, ou seja, as células parecem fusionadas (Fig. 10).

As linhagens celulares mais invasivas (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) também apresentaram alterações fenotípicas quando cultivadas nos diferentes substratos. Semelhante às linhagens MCF-7 e ZR-75-1, as linhagens MDA-MB-435 e MDA-MB-231 apresentaram fenótipo migratório quando cultivadas sobre camada de MATRIGEL™ de fina espessura. No entanto, quando as mesmas linhagens se encontraram inseridas em uma matriz tridimensional, nos agrupamentos celulares formados foi possível a distinção dos limites entre as células, as quais adquirem uma morfologia esférica (Fig. 10). A linhagem Hs578T quando plaqueada em MATRIGEL™ apresentou aumento acentuado do número de prolongamentos celulares, fenótipo mais acentuado na condição de crescimento em matriz tridimensional (Fig. 10).

Figura 9: Morfologia das linhagens celulares de carcinoma mamário humano em plástico cultivadas em diferentes densidades.

As linhagens selecionadas para o presente estudo foram estabelecidas, mantidas em meio de cultura específico e alta concentração de soro (10% SFB) por diferentes períodos de tempo. O plaqueamento foi realizado em baixa densidade celular e a cultura foi mantida até que a confluência fosse estabelecida. Fotomicrografias em aumento de 100x.

Figura 10: Morfologia das linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).

As linhagens foram plaqueadas em plástico sem revestimento (A) ou em plástico revestido com MATRIGEL™ (B e C). O revestimento das placas com MATRIGEL™ foi realizado na forma de gel de fina espessura, condição na qual é estabelecida uma camada de complexo protéico, local onde as células aderem e proliferam na camada superior (B), e na forma de gel espesso, condição na qual as células são capazes de crescer inseridas numa matriz tridimensional (C). As células foram mantidas em alta concentração de soro (10% SFB) em condições adequadas de cultura. Fotomicrografias em aumento de 100x.

Análise do potencial invasivo das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas

As linhagens celulares de carcinoma mamário selecionadas para este estudo foram também caracterizadas quanto ao potencial invasivo através de ensaios de quimioinvasão celular *in vitro*. Os ensaios foram realizados em placas do tipo Transwell®, utilizando membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) como substrato para invasão e soro (SFB) como agente quimioatrativo. Desta forma, foi possível verificar se as linhagens disponíveis no laboratório mantinham as diferenças de potencial invasivo descritas previamente, a partir das quais as linhagens foram selecionadas para este estudo.

Para estabelecimento e padronização do ensaio no laboratório, utilizou-se a linhagem celular de carcinoma mamário MDA-MB-231, previamente descrita como sendo uma linhagem celular altamente invasiva, e, como controle, a linhagem celular de fibroblasto de camundongo, NIH-3T3, que não apresenta potencial invasivo. Inicialmente, um intervalo de tempo de 6h foi utilizado para verificar a ocorrência de invasão, dado que este mesmo intervalo havia sido mantido em alguns dos estudos prévios que caracterizaram a diferença de potencial invasivo entre algumas das linhagens celulares selecionadas. As células, previamente carenciadas para soro, foram plaqueadas sobre as membranas de polycarbonato porosas das placas Transwell®, as quais foram revestidas, ou não, com MATRIGEL™, para que determinássemos a taxa de invasão e a taxa de migração celular, respectivamente.

A partir deste ensaio, observou-se que o revestimento das membranas porosas com MATRIGEL™ havia sido efetivo, dado que a linhagem celular NIH-3T3, não invasiva, não apresentou habilidade em atravessar os poros obstruídos com MATRIGEL™, sendo apenas capaz de migrar através dos poros não revestidos. Por outro lado, a linhagem celular MDA-MB-231 apresentou capacidade invasiva sendo capaz de atravessar os poros revestidos com MATRIGEL™ (Fig. 11).

Figura 11: Padronização do ensaio de invasão celular *in vitro* em placas do tipo Transwell® utilizando membrana basal reconstruível (MATRIGEL™) como substrato para invasão.

Fotomicrografias (100x) mostrando células coradas, as quais correspondem àquelas que migraram/invadiram estando estas localizadas na superfície inferior da membrana porosa. Para análise do potencial invasivo das linhagens celulares, as membranas de polycarbonato das placas foram revestidas com MATRIGEL™, obstruindo os poros. As células (1×10^5 células/poço) plaqueadas sobre as membranas revestidas, ou não, foram previamente carenciadas para soro (0% SFB, 0,1% BSA) por um período de, aproximadamente, 12h. No compartimento inferior foram adicionados meios de cultura específicos contendo alta concentração de soro (10% SFB), o qual atuou como quimioatrativo induzindo as células a migrarem (poros não obstruídos)/invadirem (poros obstruídos) em direção ao compartimento inferior. 6 horas após o plaqueamento as células foram fixadas e coradas como descrito em Materiais e Métodos.

Em seguida, padronizou-se o tempo adequado para distinção das linhagens celulares selecionadas quanto à capacidade invasiva aumentando-se o intervalo de tempo de incubação para 24 e 48h. Neste período, esperava-se que mesmo aquelas linhagens celulares descritas como pouco invasivas apresentassem taxa de migração e invasão, permitindo a distinção dos potenciais invasivos das linhagens analisadas. O ensaio foi realizado com a linhagem altamente invasiva MDA-MB-231 e com a linhagem ZR-75-1 que apresenta baixa capacidade invasiva e que demanda de um grande intervalo de tempo para aderir quando mantida em cultura. A partir dos

resultados obtidos (dados não mostrados), pudemos verificar que o tempo de 24h foi suficiente para que ambas as linhagens testadas migrassem através dos poros não revestidos. Desta forma, o ensaio foi repetido, nas condições estabelecidas, para todas as linhagens de carcinoma mamário humano selecionadas.

Pudemos observar que as linhagens celulares MCF-7 e ZR-75-1 apresentaram baixa taxa de migração em direção ao agente quimioatrativo e baixa capacidade de invasão através dos poros obstruídos. Por outro lado, observamos uma elevada taxa de migração e um alto potencial invasivo quando analisamos os resultados obtidos para as linhagens celulares MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T (Fig. 12).

Análise *in vitro* do potencial metastático das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas

A propensão de linhagens celulares à metástase tem sido demonstrada através de ensaios de formação de colônia em meio semi-sólido. Os resultados publicados sugerem que é possível estabelecer uma correlação entre a capacidade de crescimento de células tumorais em diferentes concentrações de agarose com a capacidade proliferativa destas células *in vivo* em sítios específicos de metástase (Lee & Welch, 1997; Li et al., 1989). Assim, a capacidade de formação de colônias em 0,9% de agarose (agarose dura) tem sido fortemente relacionada com eficiência metastática enquanto que o crescimento em 0,3% agarose (agarose mole) é um parâmetro que tem sido relacionado com o potencial tumorigênico da linhagem. Baseado nestes dados, ensaios de crescimento em meio semi-sólido foram realizados utilizando-se uma concentração constante de agarose na camada inferior (0,6% agarose) e variando-se a concentração de agarose na camada superior (0,3% e 0,9% agarose). A validação do ensaio *in vitro* de potencial metastático foi confrontado com a avaliação prévia das linhagens em ensaios de metástase espontânea em camundongos *nude* por Thompson et al., 1992.

Três experimentos independentes, em duplicata, foram realizados para todas as linhagens celulares selecionadas. Duas concentrações diferentes de células foram utilizadas a fim de estabelecer a concentração celular adequada, ou seja, que permitisse a posterior contagem das colônias. Para uma melhor visualização e análise do resultado, as colônias foram contadas e classificadas de acordo com o tamanho apresentado. Todas as colônias formadas apresentaram tamanho pequeno (0-150 μ m) e, portanto, foram incluídas num mesmo grupo na representação do resultado.

Pudemos verificar formação de colônias apenas nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-435 em ambas as concentrações celulares e de agarose testadas (Fig. 13). No entanto, quando foi utilizado 0,9% de agarose na camada superior, pudemos observar uma drástica redução do número de colônias formadas pela linhagem MCF-7, confirmando o baixo potencial metastático previamente observado em ensaios de metástase espontânea em camundongos *nude* (Thompson et al., 1992). Por outro lado, a linhagem MDA-MB-435, descrita como tendo maior propensão à metástase, quando submetida às mesmas condições, apresentou capacidade de formar numerosas colônias em agarose dura (0,9%), semelhante ao observado para agarose mole (0,3%) (Fig. 14).

Figura 12: Ensaio de invasão celular *in vitro* em placas do tipo Transwell® utilizando membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) como substrato para invasão.

Fotomicrografias (100x) mostrando células coradas, as quais correspondem àquelas que migraram (poros não obstruídos)/invadiram (poros obstruídos) estando estas localizadas na superfície inferior da membrana porosa. Ensaio realizado de acordo com as condições previamente estabelecidas. 24h após o plaqueamento as células foram fixadas e coradas como descrito em Materiais e Métodos.

Figura 13: Ensaio de formação de colônia em suspensão de agarose mole (0,3%) e dura (0,9%) das diferentes linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

Colônias formadas após 30 dias de crescimento das linhagens em substrato semi-sólido. As suspensões de células (10^4 células/poço) foram plaqueadas sobre a camada de agarose 0,6% em meio de cultura específico. Para a camada superior foram utilizadas duas concentrações diferentes de agarose (A- 10^4 células em 0,3% agarose e B- 10^4 células em 0,9% agarose). Ensaio representativo de três experimentos independentes realizados em duplicata. Fotomicrografias em aumento de 100x.

Figura 14: Número de colônias formadas após 30 dias de crescimento das diferentes linhagens celulares de carcinoma mamário humano em suspensão de agarose mole (A, 0,3%) e dura (B, 0,9%).

O número de colônias foi determinado 30 dias após o plaqueamento. A barra de erros representa o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. Análises estatísticas de variância ANOVA e teste a posteriori de Tuckey-Kramer. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Análise *in vivo* do potencial metastático das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas

A fim de uma melhor caracterizar melhor o potencial metastático das linhagens celulares selecionadas, foram realizados ensaios de metástase experimental em pulmão de camundongos imunodeficientes do tipo *nude*. Os dados obtidos resultam de dois experimentos independentes sendo que para cada uma das linhagens celulares analisadas foi injetado um total de seis animais. Todos os camundongos injetados, com exceção de um daqueles que receberam injeção de células da linhagem MDA-MB-231, apresentaram colônias no pulmão (Tabela 3). Após a contagem do número de colônias superficiais presentes nos pulmões, pudemos observar uma tendência de formação de um maior número de colônias nos animais que receberam a injeção de células provenientes de linhagens celulares que apresentam propensão à metástase (Fig. 15), conforme descrito previamente e constatado nos resultados anteriores.

Tabela 3: Produção de metástase experimental em pulmão de camundongos *nude* por células de carcinoma mamário humano

Linhagem tumoral	Metástase no pulmão	
	<i>Incidência / n° de camundongos</i>	<i>Média do n° de colônias (intervalo de variação)</i>
MCF-7	6/6	8 (3-16)
ZR-75-1	6/6	5 (3-14)
MDA-MB-435	6/6	11 (5-18)
MDA-MB-231	5/6	15 (6-33)
Hs578T	6/6	5 (2-8)

Figura 15: Metástase experimental de linhagens de carcinoma mamário humano em pulmão de camundongos imunodeficientes.

1x10⁶ células isoladas em suspensão em 100µl de PBSA foram injetadas na veia lateral da cauda de camundongos imunodeficientes do tipo nude, os quais foram sacrificados após 45 dias. (A) Colônias tumorais em pulmões de camundongos que receberam injeção de células de carcinoma mamário humano. (B) Número de colônias superficiais detectadas nos pulmões. Análises estatísticas de variância ANOVA e teste a posteriori de Tuckey-Kramer.

Análise do potencial proliferativo das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas

Além da análise da influência da MEC na morfologia das células, foi analisado o possível papel dos elementos de matriz presentes no MATRIGEL™ na taxa de proliferação celular das linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas para este estudo. Para perseguir tal objetivo, foram realizados ensaios de proliferação celular em plástico e em plástico revestido por uma camada de fina espessura de MATRIGEL™. Primeiramente, pudemos observar que as linhagens celulares analisadas apresentaram crescimento dependente da densidade celular ou, ainda, de fatores solúveis acumulados no meio de cultura, dado que a fase exponencial de proliferação iniciou-se apenas após, aproximadamente, 5 dias em cultura, condição na qual pôde ser observada uma elevada densidade celular. Além disso, pudemos notar que o perfil obtido a partir dos dados das curvas de crescimento para ambos os substratos foi bastante similar para todas as linhagens celulares analisadas. Para cada uma das linhagens celulares, em ambos os substratos analisados, quatro experimentos independentes foram realizados em triplicata (Fig. 16).

A partir dos resultados obtidos nas curvas de crescimento foi possível calcular parâmetros relacionados à proliferação celular como o tempo de dobramento e a densidade de saturação apresentados pelas linhagens celulares quando mantidas em condições adequadas de cultura nos diferentes substratos.

O tempo de dobramento das linhagens celulares cultivadas nos diferentes substratos, em cada um dos experimentos independentes, foi calculado a partir da aproximação de uma curva de regressão não linear sobre os dados do número de células obtidos na fase de crescimento exponencial, ou seja, entre os dias 3 e 9 das curvas de crescimento. A curva exponencial foi aproximada com base nos dados das triplicatas de modo que os coeficientes de regressão não linear (R^2) obtidos fossem o

Figura 16: Perfil do crescimento de linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) mantidas de 1 (24 horas) a 9 (216 horas) dias em cultura.

As linhagens celulares (5×10^3 células/cm²) foram plaqueadas em plástico sem revestimento ou em plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™ e mantidas em alta concentração de soro (10% SFB) em condições adequadas de cultura. Triplicatas de cada uma das condições foram coletadas por tripsinização e/ou adição de agentes quelantes, nos tempos indicados, e contadas em contador eletrônico. A barra de erro representa o desvio padrão das triplicatas obtidas. Experimento representativo de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

mais próximo de 1. Para análise dos resultados, foram considerados os tempos médios de dobramento obtidos com base nas curvas exponenciais aproximadas para os quatro experimentos independentes (Fig. 17).

Análises estatísticas de variância (ANOVA e teste *a posteriori* de Tukey-Kramer) mostraram que não existe diferença estatisticamente significativa entre o tempo de dobramento de cada uma das linhagens celulares cultivadas nos diferentes substratos, plástico e MATRIGEL™, sugerindo que os elementos de matriz presentes no MATRIGEL™ não exercem papel no controle da proliferação celular destas linhagens. Além disso, nenhuma diferença significativa pôde ser observada quando comparamos as diferentes linhagens entre si, para um mesmo substrato. Tal fato sugere que não há correlação entre a aquisição de capacidade invasiva e metastática e a aquisição de vantagem proliferativa *in vitro* nas linhagens celulares de carcinoma mamário humano analisadas.

Da mesma forma, a partir dos dados obtidos nos quatro ensaios independentes de crescimento celular, calculou-se a densidade de saturação média das linhagens cultivadas nos diferentes substratos. A partir da análise dos dados, inferiu-se que as células atingiram a densidade de saturação apenas depois de mantidas em cultura durante um período de nove dias (Fig. 18).

Análises estatísticas de variância (ANOVA e teste *a posteriori* de Tukey-Kramer) dos valores obtidos para densidade de saturação mostram que não existe diferença significativa quando as linhagens celulares são cultivadas nos diferentes substratos, plástico e MATRIGEL™, sugerindo que não existe papel dos elementos de matriz presentes no MATRIGEL™ na regulação da sinalização de parada de crescimento por contato célula-célula. Quando se compara a densidade de saturação das diferentes linhagens entre si, para um mesmo substrato, pudemos observar diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4). No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre a diferença no valor da densidade de saturação com

o potencial invasivo e metastático, dado que linhagens celulares de características semelhantes apresentam valores significativamente diferentes de densidade de saturação.

Figura 17: Tempo de dobramento médio das linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).

O tempo de dobramento foi calculado de acordo com as curvas de regressão não linear geradas a partir dos dados do número de células obtidos nos ensaios de curva de crescimento no período entre o dia 3 (72 horas) e o 9º dia de crescimento (216 horas). A barra de erros representa o desvio padrão das medidas obtidas nos quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Análises estatísticas de variância ANOVA e teste a posteriori de Tuckey-Kramer.

Figura 18: Densidade de saturação das linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).

Resultados obtidos a partir dos dados dos ensaios de curva de crescimento. Cálculo baseado na média do número de células por cm² da placa de cultura correspondente ao 9º dia de cultivo. A barra de erros representa o desvio padrão das

medidas obtidas nos quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Análises estatísticas de variância ANOVA e teste a posteriori de Tuckey-Kramer.

Tabela 4: Análise estatística dos dados de densidade de saturação de linhagens celulares de carcinoma mamário humano quando cultivadas em plástico e em plástico revestido com MATRIGEL™, obtidos a partir dos ensaios de proliferação.

<i>Linhagens celulares</i>	<i>Condição de cultivo</i>	<i>p-value</i>
MCF-7 vs ZR-75-1	PLÁSTICO	p<0,001
MCF-7 vs MDA-MB-435		p<0,05
ZR-75-1 vs MDA-MB-435		p<0,001
MDA-MB-435 vs MDA-MB-231		p<0,001
MDA-MB-435 vs Hs578T		p<0,001
MCF-7 vs ZR-75-1	MATRIGEL	p<0,001
MCF-7 vs Hs578T		p<0,001
ZR-75-1 vs MDA-MB-435		p<0,001
MDA-MB-435 vs MDA-MB-231		p<0,001
MDA-MB-435 vs Hs578T		p<0,001

Valores de p obtidos após submissão dos dados de densidade de saturação das linhagens celulares cultivadas sobre diferentes substratos ao teste estatístico de análise de variância ANOVA e teste a posteriori de Tuckey-Kramer.

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs) E DE SEUS INIBIDORES, OS INIBIDORES TECIDUAIS (TIMPs) E O INIBIDOR ASSOCIADO À MEMBRANA, RECK, E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MMPs EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO.

No presente estudo, foram detectados os níveis de expressão gênica das MMPs cuja atividade apresenta maior relevância durante o processo de invasão celular em câncer de mama e que são negativamente reguladas por RECK, ou seja: Gelatinase-A (MMP-2), Gelatinase-B (MMP-9) e a Metaloproteinase de Matriz do tipo membrana -1 (MMP-14/MT1-MMP). A fim de correlacionarmos a expressão gênica e a atividade proteolítica das MMPs com a capacidade invasiva/metastática das linhagens celulares de carcinoma mamário, a atividade das gelatinases foi analisada através de ensaios de Zimografia. Desta forma, foi possível inferir o papel dos inibidores de metaloproteinases de matriz na regulação da atividade das MMPs, o que determina a degradação da MEC na invasão e metástase do tumor de mama *in vivo*. Além disso, a fim de avaliar o papel dos inibidores de metaloproteinase de matriz durante o processo de invasão, os níveis de expressão gênica relativa dos inibidores teciduais

secretados TIMP-1 e TIMP-2 e do inibidor associado à membrana RECK também foram analisados nas linhagens celulares selecionadas.

Deteção dos níveis de expressão relativa através de ensaios de *Real-Time PCR*

Os níveis relativos de expressão dos genes analisados foram determinados, nas linhagens celulares de câncer de mama humano previamente selecionadas e caracterizadas, através de ensaios de *Real-Time PCR*. Dado que a análise da expressão gênica em células cultivadas em MATRIGEL™ poderia sugerir uma regulação da expressão do gene alvo através de interação célula-elementos de matriz, evento que ocorre durante o processo de invasão celular, as linhagens foram cultivadas em plástico não revestido e em plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™, durante períodos de 3 e 5 dias (Fig. 19).

Os resultados dos ensaios de *Real-Time PCR* representam os valores médios obtidos das duplicatas provenientes de dois experimentos independentes. Os valores estão representados na forma de expressão gênica relativa, calculada conforme descrito em Materiais e Métodos, sendo a amostra tomada como referência a linhagem MCF-7 cultivada em plástico sem revestimento durante 3 dias. Os genes utilizados como controle endógeno para estes ensaios foram os que codificam para as proteínas GAPDH e β -tubulina. Estes genes não apresentaram alteração da expressão gênica entre as linhagens celulares analisadas ou quando estas foram submetidas aos diferentes tratamentos. Os resultados representados são aqueles normalizados pela expressão gênica do GAPDH sendo que resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se a β -tubulina como controle. Os pares de *primers* específicos para os genes analisados foram utilizados numa concentração final de 600nM. O cálculo da eficiência dos *primers* foi determinado, como descrito em Materiais e Métodos, após análise das curvas de regressão linear obtidas em condições experimentais específicas (Fig. 20 e Tabela 5). As linhagens foram

dispostas nos gráficos partindo-se de uma linhagem celular pouco invasiva e não metastática em ordem crescente até uma linhagem altamente invasiva e metastática.

Figura 19: Morfologia e densidade celular das linhagens celulares de carcinoma mamário cultivadas durante 3 e 5 dias em plástico sem revestimento e plástico revestido com membrana basal reconstituível (MATRIGEL™). As diferentes linhagens foram plaqueadas em placas P100 e mantidas em cultura por um período de 3 e 5 dias. Após este período, as células foram lisadas para posterior obtenção do RNA total, como descrito em Materiais e Métodos. Fotomicrografias em aumento de 100x. (A-3 dias em plástico, B-3 dias em MATRIGEL™, C-5 dias em plástico e D-5 dias em MATRIGEL™).

Figura 20: Curvas de regressão linear obtidas para determinação da eficiência dos *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica em linhagens celulares de carcinoma mamário humano nos experimentos de *Real-Time PCR*.

Reações contendo *primers* numa concentração final determinada previamente foram realizadas utilizando como template diluições seriadas de uma mistura de cDNAs provenientes de diferentes linhagens de carcinoma mamário humano. Uma análise de regressão linear foi realizada a partir dos valores obtidos de Ct em função do logaritmo da respectiva diluição. Os coeficientes angulares das retas obtidas foram utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*.

Tabela 5: Concentração final e eficiência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica em linhagens celulares de carcinoma mamário humano através de ensaios de *Real-Time PCR*.

PRIMER	Concentração	Coefficiente angular	Eficiência (%)
<i>MMP-2</i>	600nM	-3,23	104
<i>MMP-9</i>	600nM	-2,9	121
<i>MMP-14</i>	600nM	-3,19	106
<i>TIMP-1</i>	600nM	-3,63	88
<i>TIMP-2</i>	600nM	-2,92	121
<i>RECK</i>	600nM	-3,58	90
<i>GAPDH</i>	600nM	-3,16	107

Concentração final de primer utilizada nas reações de *Real-Time PCR*.

Coefficiente angular das regressões lineares representadas na figura 20 utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers como descrito em *Materiais e Métodos*.

As diferenças de expressão gênica relativa foram primeiramente analisadas para as diferentes linhagens celulares quando mantidas numa mesma condição, ou seja, mantidas em cultura sobre o mesmo substrato por um determinado período de tempo. Nestas análises, os níveis de expressão gênica relativa das linhagens celulares de caráter invasivo e metastático (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) foram comparados com os níveis de expressão detectados nas linhagens de fenótipo menos agressivo (MCF-7 e ZR-75-1). Desta forma, foi possível correlacionar a expressão gênica em questão com a capacidade invasiva/metastática das linhagens de carcinoma mamário humano. Além disso, a fim de correlacionar o contato célula-elementos de matriz presentes no MATRIGEL™ com a alteração da expressão gênica, analisou-se a expressão relativa do gene em questão quando uma mesma linhagem foi mantida sobre os diferentes substratos por um período de tempo determinado.

Padrão de expressão gênica das metaloproteinases de matriz durante a progressão do câncer de mama

Os níveis de expressão gênica relativa da *MMP-2* mostraram-se, de modo geral, elevados nas linhagens celulares de caráter mais invasivo e metastático (MDA-

MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) em relação às linhagens pouco invasivas e não metastáticas (MCF-7 e ZR-75-1) (Fig. 21). A linhagem Hs578T, altamente invasiva e metastática, apresentou valores de expressão gênica relativa da MMP-2 extremamente elevados, em todas as condições analisadas, em relação aos valores apresentados pelas linhagens celulares de caráter menos agressivo ($p < 0,001$). As linhagens MDA-MB-435 e MDA-MB-231, também apresentaram valores elevados para expressão da MMP-2 em relação aos valores apresentados pelas linhagens celulares pouco invasivas e não metastáticas, no entanto, esta diferença não apresentou significância estatística nas análises de múltiplas comparações dados os elevados valores detectados para a linhagem Hs578T. Para algumas das linhagens celulares analisadas, a expressão da MMP-2 foi regulada pelo contato das células com MATRIGEL™, dada a observação de diferenças estatisticamente significativas de expressão da MMP-2 quando as células foram plaqueadas sobre os diferentes substratos (Tabela 6).

Os resultados sugerem que a expressão gênica da MMP-2 exerce um papel importante na capacidade invasiva e metastática das linhagens de carcinoma mamário humano MDA-MB-435 e Hs578T.

A expressão gênica da MMP-9 mostrou-se elevada nas linhagens celulares de caráter mais invasivo e metastático (Fig. 21). A linhagem MDA-MB-231, altamente invasiva, apresentou valores de expressão gênica relativa da MMP-9 significativamente elevados ($p < 0,05$) quando a linhagem foi cultivada durante 5 dias sobre os diferentes substratos, em relação aos valores apresentados pelas linhagens celulares pouco invasivas e não metastáticas mantidas nas mesmas condições de cultura. As linhagens MDA-MB-435 e MDA-MB-231, também apresentaram valores elevados para expressão da MMP-9 em relação aos valores apresentados pelas

linhagens celulares de caráter menos agressivo, em algumas das condições analisadas. Algumas das linhagens celulares analisadas apresentaram alteração estatisticamente significativa da expressão da MMP-9 quando cultivadas sobre plástico revestido com MATRIGEL™ (Tabela 6).

Os resultados sugerem que a expressão gênica da MMP-9 exerce um papel importante na capacidade invasiva da linhagem MDA-MB-231.

A expressão gênica da MMP-14 (MT1-MMP) mostrou-se elevada nas linhagens celulares de caráter mais invasivo e metastático (Fig. 21). A linhagem MDA-MB-231, altamente invasiva, apresentou valores de expressão gênica relativa da MMP-14 significativamente elevados em relação aos valores apresentados pelas linhagens pouco invasivas e não metastáticas ($p < 0,001$). Resultados estatisticamente significativos também foram observados para a linhagem Hs578T na maioria das condições analisadas ($p < 0,001$). Para todas as linhagens analisadas, a expressão da MMP-14 (MT1-MMP) não foi alterada pelo contato das células com o MATRIGEL™ (Tabela 6).

Os resultados sugerem que a expressão gênica da MMP-14 exerce um papel importante na capacidade invasiva e metastática das linhagens MDA-MB-231 e Hs578T.

Figura 21: Análise da expressão gênica de metaloproteinases de matriz em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

As linhagens celulares foram cultivadas em plástico não revestido e em plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™, durante 3 e 5 dias. Níveis de expressão relativa do mRNA, após normalização pelo gene de expressão constitutiva GAPDH, detectados através de ensaios de Real-Time PCR utilizando primers específicos para os genes analisados. A barra de erros representa o desvio padrão dos resultados obtidos nos dois experimentos independentes realizados em duplicata. Análises estatísticas de variância ANOVA e teste a posteriori de Tukey-Kramer. ** $p < 0,001$

Atividade das metaloproteinases de matriz durante a progressão do câncer de mama

A atividade das Gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) foi detectada através de ensaios de Zimografia, conforme descrito em Materiais e Métodos, utilizando-se meio de cultura condicionado pelas linhagens celulares de câncer de mama mantidas nos diferentes substratos: plástico sem revestimento e plástico revestido com uma camada de fina espessura de MATRIGEL™. Os ensaios

foram realizados utilizando-se meio condicionado proveniente de três experimentos independentes (Fig. 22).

Os resultados dos ensaios de Zimografia corroboram os dados de expressão relativa das MMPs obtidos pela técnica de *Real-Time PCR*. Linhagens celulares de carcinoma mamário humano que apresentam fenótipo invasivo e metastático apresentam maior expressão relativa e maior atividade de metaloproteinases envolvidas em carcinogênese (MMP-2 e MMP-9) em relação às linhagens pouco invasivas e não metastáticas. A linhagem Hs578T, altamente invasiva e metastática, apresentou atividade da MMP-2 extremamente elevada quando comparada com as linhagens celulares de comportamento menos agressivo, dado que correlaciona com os níveis de expressão gênica da MMP-2 obtidos para esta linhagem em ensaios de *Real-Time PCR*. A linhagem MDA-MB-231, altamente invasiva, apresentou atividade elevada da MMP-9 corroborando os resultados de expressão gênica relativa previamente apresentados. Além disso, quando se observa os resultados obtidos para células cultivadas em MATRIGEL™, em relação às condições de cultivo em plástico sem revestimento, é possível notar um aumento significativo da atividade gelatinolítica, sugerindo um papel do contato célula-elementos de matriz presentes no MATRIGEL™ na regulação da atividade das MMPs.

Os resultados sugerem que a atividade da MMP-2 exerce um papel-chave na capacidade invasiva e metastática da linhagem de carcinoma mamário humano Hs578T. A atividade da MMP-9 exerce um papel importante na invasividade da linhagem MDA-MB-231 através de membranas basais.

Figura 22: Atividade gelatinolítica de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) em linhagens celulares de carcinoma mamário humano detectada através de ensaio de Zimografia.

Ensaio de Zimografia utilizando meio condicionado de linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas durante 72h em plástico não revestido e em plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™. 25µg de proteína de cada uma das amostras foram fracionadas em gel de poliácridamida contendo gelatina, substrato da atividade proteolítica das gelatinases. As posições referentes a sítios de atividade das Gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) estão indicadas na figura. Zimograma representativo de três experimentos independentes.

Padrão de expressão gênica dos inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz (TIMPs) durante a progressão do câncer de mama

De modo geral, as linhagens celulares de caráter mais invasivo e metastático (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) apresentaram maior expressão gênica relativa do inibidor tecidual de MMP, TIMP-1, em relação às linhagens pouco invasivas e não metastáticas (MCF-7 e ZR-75-1), sendo que os valores obtidos são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em algumas das condições analisadas (Fig. 23). Além disso, algumas das linhagens celulares analisadas apresentaram alteração significativa da expressão gênica relativa de TIMP-1 quando mantidas em cultura sobre MATRIGEL™ por 3 ou 5 dias, sugerindo a existência de uma regulação da expressão deste inibidor durante o processo de invasão de células de carcinoma mamário através de membranas basais (Tabela 6).

A expressão gênica relativa de TIMP-2, de maneira semelhante ao obtido para o inibidor da atividade de MMP, TIMP-1, apresentou-se significativamente elevada nas linhagens celulares de caráter mais invasivo e metastático nas diferentes condições analisadas ($p < 0,001$) (Fig. 23). Para algumas das linhagens celulares, a expressão de TIMP-2 foi alterada pelo contato das células com MATRIGEL™, dada a observação de diferenças estatisticamente significativas de expressão da MMP-2 quando as células foram mantidas durante 5 dias sobre os diferentes substratos (Tabela 6).

Os resultados sugerem que a expressão dos inibidores endógenos de MMPs (TIMP-1 e TIMP-2) correlaciona positivamente com o fenótipo invasivo e metastático de linhagens de carcinoma mamário humano.

Figura 23: Análise da expressão gênica de inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

As linhagens celulares foram cultivadas em plástico não revestido e em plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™, durante 3 e 5 dias. Níveis de expressão relativa do mRNA, após normalização pelo gene de expressão constitutiva GAPDH, detectados através de ensaios de Real-Time PCR utilizando primers específicos para os genes analisados. A barra de erros representa o desvio padrão dos resultados obtidos nos dois experimentos independentes realizados em duplicata. Análises estatísticas de variância ANOVA e teste a posteriori de Tuckey-Kramer.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Padrão de expressão gênica do inibidor associado à membrana RECK durante a progressão do câncer de mama

As linhagens de caráter mais invasivo e metastático (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) apresentaram valores de expressão gênica relativa de *RECK* significativamente elevados quando comparados com as linhagens pouco invasivas e não metastáticas (MCF-7 e ZR-75-1), em todas as condições analisadas ($p < 0,001$) (Fig. 24). Resultados semelhantes foram observados em ensaios de *Northern Blot*

para células mantidas nas mesmas condições de cultura, sugerindo a ocorrência de uma correlação entre a expressão do gene *RECK* e a maior capacidade invasiva/metastática das linhagens de carcinoma mamário humano analisadas (Fig. 25).

A expressão de *RECK* foi alterada pelo contato de algumas linhagens celulares com o MATRIGEL™, podendo ser observada diferença estatisticamente significativa de expressão deste gene quando a mesma linhagem foi plaqueada nos diferentes substratos (Tabela 6).

Os resultados sugerem que a expressão do gene supressor de metástase *RECK*, capaz de suprimir a atividade de metaloproteinases envolvidas na progressão do câncer de mama, correlaciona positivamente com o fenótipo invasivo e metastático de linhagens de carcinoma mamário humano, de maneira semelhante ao observado para os inibidores teciduais secretados.

Correlação entre os níveis relativos de expressão das metaloproteinases de matriz e seus inibidores durante a progressão do câncer de mama

A partir dos resultados de expressão gênica relativa, obtidos através da técnica de *Real-Time PCR*, foi possível avaliar a existência de correlação entre os níveis de expressão dos genes das metaloproteinases de matriz MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP), e os níveis de expressão dos inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-2 e do inibidor associado à membrana *RECK*, durante a progressão do câncer de mama humano. Os resultados de expressão gênica relativa de cada um dos genes analisados nas linhagens celulares de carcinoma mamário humano selecionadas, mantidas nas condições de cultura descritas previamente, foram submetidos a análises estatísticas de Correlação de Pearson (Fig. 26).

Figura 24: Análise da expressão gênica do inibidor de metaloproteinasas de matriz associado à membrana, RECK, em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

As linhagens celulares foram cultivadas em plástico não revestido e em plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™, durante 3 e 5 dias. Níveis de expressão relativa do mRNA, após normalização pelo gene de expressão constitutiva GAPDH, detectados através de ensaios de Real Time PCR utilizando primers específicos para os genes analisados. A barra de erros representa o desvio padrão dos resultados obtidos nos dois experimentos independentes realizados em duplicata. Análises estatísticas de variância ANOVA e teste a posteriori de Tuckey-Kramer. ** $p < 0,001$

Tabela 6: Análise estatística dos dados de expressão gênica relativa de metaloproteinasas de matriz e de seus inibidores em linhagens celulares de carcinoma mamário humano quando cultivadas em plástico e em plástico revestido com MATRIGEL™.

Plástico vs Matrigel – 3 dias						
Linhagens celulares	MMP-2	MMP-9	MMP-14	TIMP-1	TIMP-2	RECK
MCF-7	0,261	0,082	0,935	0,231	0,881	0,004
ZR-75-1	0,006	0,008	0,415	0,425	0,645	0,013
MDA-MB-435	0,009	0,210	0,185	0,049	0,555	0,769
MDA-MB-231	0,005	0,736	0,728	0,507	0,486	0,013
Hs578T	0,699	0,450	0,148	0,597	0,390	0,122
Plástico vs Matrigel – 5 dias						
Linhagens celulares	MMP-2	MMP-9	MMP-14	TIMP-1	TIMP-2	RECK
MCF-7	0,150	0,004	0,375	0,021	0,315	0,026
ZR-75-1	0,548	0,227	0,916	0,356	0,239	0,958
MDA-MB-435	0,032	0,160	0,264	0,409	0,676	0,016
MDA-MB-231	0,009	0,081	0,056	0,007	0,038	0,023
Hs578T	0,690	0,051	0,077	0,018	0,014	0,077

Valores de p obtidos após submissão dos dados de expressão gênica relativa de linhagens celulares cultivadas sobre diferentes substratos ao teste estatístico T de Student não pareado.

Figura 25: Perfil de expressão do gene supressor de metástase *RECK* em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

(A) Ensaio de Northern Blot. Membrana contendo RNA total das linhagens celulares de carcinoma mamário selecionadas para o presente estudo, plaqueadas em plástico não revestido ou plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™, mantidas em cultura por um período de 3 ou 5 dias. A membrana foi hibridizada com sonda radioativa correspondente ao gene *RECK* e com sonda correspondente ao gene de expressão constitutiva da fosfoproteína ribossomal ácida (36B4, controle interno). Detecção realizada em aparelho Scanner Storm™ PhosphorImager. (B) Fracionamento de 20µg de RNA total em gel agarose-formaldeído representativo de um experimento. RNAs ribossomais fracionados estão indicadas na figura.

As análises estatísticas demonstraram a existência de uma correlação positiva estatisticamente significativa entre os níveis de expressão relativa de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens de carcinoma mamário humano que apresentam diferenças na capacidade invasiva e na propensão à metástase, mantidas sob diferentes condições de cultura (Tabela 7).

Figura 26: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

As linhagens celulares foram cultivadas em plástico não revestido e em plástico revestido com camada de fina espessura de MATRIGEL™, durante 3 e 5 dias. Níveis de expressão relativa do mRNA, após normalização pelo gene de expressão constitutiva GAPDH, detectados através de ensaios de Real-Time PCR utilizando primers específicos para os genes analisados. Análises estatísticas de correlação de Pearson.

(n) Número de amostras analisadas (r) Coeficiente de correlação de Pearson

Tabela 7: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens celulares de carcinoma mamário humano.

Teste de correlação de Pearson		r	p-value	n
MMP-2	MMP-9	-0,1700	p=0,1625	69
	MMP-14	0,4720	p<0,0001	72
	TIMP-1	0,2494	p=0,0346	72
	TIMP-2	0,1034	p=0,3979	69
	RECK	0,4377	p<0,0001	72
MMP-9	MMP-14	0,7488	p<0,0001	70
	TIMP-1	0,3576	p=0,0022	71
	TIMP-2	0,5207	p<0,0001	67
	RECK	0,3238	p=0,0059	71
MMP-14	TIMP-1	0,5242	p<0,0001	75
	TIMP-2	0,6718	p<0,0001	70
	RECK	0,6750	p<0,0001	74
TIMP-1	TIMP-2	0,6818	p<0,0001	71
	RECK	0,6625	p<0,0001	75
TIMP-2	RECK	0,8009	p<0,0001	70

Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste de correlação de Pearson.

(n) Número de amostras analisadas

(r) Coeficiente de correlação de Pearson

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs) E DE SEUS INIBIDORES, OS INIBIDORES TECIDUAIS (TIMPs) E O INIBIDOR ASSOCIADO À MEMBRANA, RECK, EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA E DE BORDA NORMAL ADJACENTE.

Seleção das amostras clínicas

A fim de validar os perfis de expressão gênica observados para os genes MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 e RECK nas linhagens tumorais de mama que apresentam diferenças na capacidade invasiva e na propensão à metástase, foram selecionadas, do banco de tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo e do banco de tumores do Hospital do Câncer de Mato Grosso do Sul, 72 amostras de carcinomas ductais invasivos de mama e 30 amostras de borda normal adjacente ao tumor. As amostras selecionadas foram processadas e tiveram seu RNA extraído conforme descrito em Materiais e Métodos. Um exemplo do resultado da extração de

RNA de algumas amostras tumorais e da respectiva borda normal pode ser visualizado na figura 27.

Figura 27: Fracionamento de RNA total em gel de agarose contendo tiocianato de guanidina para verificação da qualidade e da integridade da preparação.

(A) Fracionamento de 1µg de RNA total obtido a partir de linhagens celulares de carcinoma mamário humano cultivadas sobre plástico sem revestimento. (B) Fracionamento de 1µg de RNA total obtido a partir de amostras teciduais de tumores primários de mama e da respectiva borda normal adjacente. Preparações de RNA total obtidas pela metodologia de Chirgwin et al., 1979, descrita em *Materiais e Métodos*, fracionadas em gel de agarose contendo isotiocianato de guanidina 20mM. As posições referentes aos RNAs ribossomais estão indicadas na figura. EC, Estádio Clínico.

Levantamento dos dados clínico-patológicos das pacientes incluídas no estudo

Para cada uma das 40 amostras tumorais provenientes do banco de tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo foram levantados os dados clínico-patológicos referentes às pacientes através da análise detalhada dos prontuários. Os dados clínicos levantados incluíram: a data de nascimento, a data do diagnóstico da doença, o estadiamento do tumor segundo o sistema de Classificação TNM, a presença de linfonodos comprometidos, a presença de marcadores moleculares RE (receptor de estrógeno) e RP (receptor de progesterona), a ocorrência de recidivas locais e à distância, o tempo de seguimento e o tempo de sobrevida das pacientes. As pacientes incluídas no estudo haviam sido submetidas à ressecção segmentar ou mastectomia total. O acompanhamento da doença foi realizado a cada 6 meses nos primeiros 2 anos e uma vez ao ano após este período. Os dados clínico patológicos estão resumidos na tabela 8.

Dentre as 40 pacientes analisadas, a média de idade no momento do diagnóstico da doença foi de 53,2 anos. A média de tempo de seguimento destas pacientes foi de 42,96 meses. Das 40 pacientes analisadas, 9 (22,5%) apresentaram recidiva da doença e 6 (15%) morreram durante o período de seguimento.

O levantamento dos dados clínicos-patológicos referentes às 32 amostras tumorais de pacientes do Hospital do Câncer Alfredo Abrão foi realizado através da análise dos laudos laboratoriais fornecidos pelo Dr. Adalberto Abrão Siufi. Os dados clínicos levantados incluem: a data do diagnóstico da doença, o estadiamento do tumor segundo o sistema de Classificação TNM, a presença de linfonodos comprometidos e a presença de marcadores moleculares RE (receptor de estrógeno) e RP (receptor de progesterona).

Tabela 8: Distribuição dos dados clínico-patológicos das 40 pacientes do Hospital do Câncer A. C. Camargo – Instituto Ludwig

AMOSTRA	RGH	D.Nasc.	D.Diag.	TNM	T	N	M	Linf.	N.Linf.	RE	RP	Recid.	D.Recid.	D.Seg.	Stat.	D.Óbito
36	01.02443-4	06.05.63	21.06.01	2b	2	1	0	1	2/29	0	1	0	--	12.07.04	0	--
38	01.04530-0	24.12.38	14.02.02	3b	4	0	0	0	0/29	1	0	1	26.05.04	13.07.04	1	13.07.04
39	02.01002-0	04.01.27	14.03.02	2b	2	1	0	1	10/21	1	1	0	--	08.03.05	0	--
40	78.01162-0	07.02.48	02.04.02	2b	2	1	0	1	2/14	1	0	0	--	09.11.05	0	--
41	02.01347-9	22.06.62	16.04.02	2b	2	1	0	1	1/22	0	0	0	--	21.11.05	0	--
42	01.04406-0	27.06.42	16.04.02	4	2	x	1	1	15/24	9	9	1	06.03.02	13.07.04	1	13.07.04
43	02.01129-8	11.12.53	30.07.02	2b	3	0	0	0	0/36	0	0	1	23.03.05	30.11.05	0	--
45	02.03132-9	09.02.33	20.08.02	3a	2	2	0	1	4/44	0	0	0	--	03.10.05	0	--
46	01.00287-2	12.04.39	06.02.01	2a	2	0	0	0	0/20	1	0	0	--	04.07.05	0	--
51	01.01229-0	24.05.25	26.04.01	2a	2	1	0	0	1/23	1	1	0	--	12.06.01	0	--
52	01.00866-8	13.07.56	22.03.01	2a	2	0	0	0	0/23	0	0	0	--	28.05.05	0	--
54	00.04236-6	02.08.48	24.10.00	2a	1	1	0	0	1/18	1	1	0	--	25.06.04	0	--
55	01.00333-0	22.05.50	20.02.01	2a	2	0	0	0	0/14	1	1	0	--	29.03.04	0	--
57	02.03277-5	16.11.59	03.09.02	2b	2	1	0	1	15/27	0	0	1	09.06.04	16.11.05	0	--
58	02.04766-7	15.12.72	22.11.02	2a	1	1	0	1	1/19	1	1	0	--	19.10.05	0	--
59	03.01366-9	11.05.51	16.04.03	3a	2	2	0	1	5/27	1	1	0	--	01.12.05	0	--
60	03.01507-6	17.01.64	08.05.03	1	1	0	0	0	0/15	0	0	0	--	19.10.05	0	--
61	01.01777-2	07.09.39	03.05.01	2a	2	0	0	0	0/17	1	1	0	--	30.11.05	0	--
62	01.02295-4	17.10.19	07.06.01	2b	2	1	0	1	3/31	1	1	1	15.10.03	10.11.03	1	10.11.03
63	01.01901-5	28.12.42	26.06.01	2b	2	1	0	1	1/25	1	1	0	--	12.12.05	0	--
64	01.03795-1	04.02.37	06.09.01	1	1	0	0	0	0/23	1	0	0	--	28.11.05	0	--
65	01.03343-3	17.01.59	23.08.01	2b	2	1	0	1	6/38	1	1	0	--	20.05.05	0	--
66	03.00970-0	08.03.36	20.05.03	2a	2	0	0	0	0/14	0	0	0	--	16.11.05	0	--
67	03.02356-7	26.07.48	01.07.03	3a	3	2	0	1	13/33	1	1	1	30.05.05	31.10.05	0	--

AMOSTRA	RGH	D.Nasc.	D.Diag.	TNM	T	N	M	Linf.	N.Linf.	RE	RP	Rec.	D.Rec.	D.Seg.	Stat.	D.Óbito
68	03.02145-9	05.06.50	17.07.03	3c	3	3	0	1	15/51	0	0	1	27.01.05	30.03.05	1	30.03.05
69	03.02247-1	26.07.46	17.07.03	3b	4	1	0	1	8/16	0	0	1	30.06.04	25.07.04	1	25.07.04
70	03.02795-3	16.12.64	05.08.03	3a	2	2	0	1	5/26	1	1	0	--	20.10.05	0	--
71	03.03261-2	11.03.37	14.08.03	2b	2	1	0	1	1/17	1	1	0	--	07.03.04	1	07.03.04
71*	97.04691-4	08.02.62	16.12.97	2b	2	1	0	1	4/24	1	0	0	--	17.10.05	0	--
72	03.03880-7	10.04.59	30.09.03	1	1	0	0	0	9	1	1	0	--	16.08.05	0	--
73	81.01037-0	29.03.51	07.06.01	2a	1	1	0	1	1/17	1	1	0	--	07.11.05	0	--
158	98.00252-0	14.08.17	17.02.98	2a	2	0	0	0	0/24	1	1	0	--	28.08.03	0	--
181	98.00475-1	01.10.30	05.03.98	2a	1	2	0	1	3/19	1	0	0	--	09.05.05	0	--
921	99.01834-9	13.10.58	13.05.99	2b	2	1	0	1	2/21	0	0	0	--	02.02.06	0	--
1022	99.02328-8	26.08.31	06.07.99	1	1	0	0	0	0/27	0	0	0	--	17.01.06	0	--
1263	99.04238-0	26.09.43	09.11.99	2b	2	1	0	1	3/30	1	0	0	--	07.11.05	0	--
1316	71.03478-1	09.09.53	09.12.99	2b	2	1	0	1	1/31	1	1	0	--	23.11.05	0	--
1403	98.03509-6	15.09.69	17.02.00	3b	4	1	0	0	0/10	0	0	0	--	16.03.05	0	--
1587	00.01874-0	31.08.51	03.05.00	2a	2	0	0	0	0/16	1	1	0	--	01.08.05	0	--
1658	00.02219-5	26.01.54	13.06.00	3a	2	2	0	1	13/43	1	1	1	05.08.00	17.10.05	0	--

Amostra – refere-se ao número de cadastro do tumor no laboratório; RGH – refere-se ao registro hospitalar da paciente; D.Nasc. – refere-se ao ano de nascimento da paciente; D.Diag. – refere-se a data que o tumor foi diagnosticado; TNM – refere-se ao estágio clínico do tumor segundo a Classificação TNM; T – tamanho do tumor; N – presença de linfonodos comprometidos; M – presença de metástase em sítios secundários; Linf. – presença de linfonodos comprometidos ou não (0=negativo e 1=positivo); N.Linf. número de linfonodos comprometidos dentre os analisados em cada paciente; RE – status do receptor de estrógeno (0=negativo e 1=positivo); RP – status do receptor de progesterona (0=negativo e 1=positivo); Recid. – ocorrência ou não de recidiva da doença (0=não e 1=sim); D.Recid. – data da recidiva do tumor caso tenha ocorrido; D.Seg. – data da última consulta realizada no Hospital pela paciente; Stat. – refere-se ao status da paciente (0=viva e 1=morta). D.Óbito – data do óbito caso a paciente tenha falecido. A presença do número 9 em alguns quadrantes representa que o parâmetro não foi analisado na paciente ou que este não se encontrava disponível no prontuário.

Dado o fato de não ter sido realizada a análise dos prontuários, não dispomos dos dados de seguimento destas pacientes e, portanto, estas não serão incluídas em algumas das categorias de análise dos dados clínico-patológicos. Os dados clínico-patológicos estão resumidos na tabela 9.

Tabela 9: Distribuição dos dados clínico-patológicos das 32 pacientes do Hospital do Câncer Alfredo Abrão.

AMOSTRA	D. Diag.	TNM	T	N	M	Linf.	N. Linf.	RE	RP
12	9/12/2003	2b	2	1	0	1	14/16	9	9
15	15/12/2003	4	4	1	1	1	11/13	9	9
23	27/1/2004	4	2	2	1	1	5/5	9	9
24	28/1/2004	2b	2	1	0	1	9/10	1	1
38	17/2/2004	1	1	0	0	0	0/11	1	0
39	18/2/2004	4	4	1	1	1	19/19	9	9
40	19/2/2004	2b	3	0	0	0	9	9	9
50	15/3/2004	3b	4	1	0	1	4/6	1	1
51	15/3/2004	1	1	0	0	0	0/15	1	1
52	17/3/2004	3b	4	1	0	1	3/7	9	9
56	22/3/2004	3a	3	1	0	1	14/15	1	0
57	24/3/2004	2b	3	0	0	0	9	0	0
58	24/3/2004	3b	4	1	0	1	21/21	9	9
60	29/3/2004	2b	3	0	0	0	9	9	9
63	2/4/2004	2a	2	0	0	0	0/5	9	9
71	28/4/2004	1	1	0	0	0	9	9	9
74	12/5/2004	2b	3	0	0	0	9	1	1
77	26/5/2004	1	1	0	0	0	0/5	9	9
79	1/6/2004	3a	3	1	0	1	17/19	9	9
80	3/6/2004	1	1	0	0	0	0/13	1	1
81	7/6/2004	3a	3	1	0	1	4/15	9	9
82	15/6/2004	2a	2	0	0	0	0/10	1	1
84	21/6/2004	3b	4	1	0	1	8/15	1	1
85	22/6/2004	2a	2	0	0	0	0/10	9	9
86	24/6/2004	2b	3	0	0	0	0/14	1	9
88	29/6/2004	3b	4	1	0	1	7/8	1	0
91	6/7/2004	1	1	0	0	0	0/9	1	0
95	27/7/2004	3b	4	1	0	1	13/15	1	1
110	17/9/2004	1	1	0	0	0	0/10	0	0
114	28/9/2004	3a	3	1	0	1	3/15	1	1
123	26/10/2004	2a	1	1	0	1	12/14	1	1
126	3/11/2004	4	4	1	1	1	9/14	9	9

Amostra – refere-se ao número de cadastro do tumor no laboratório; *D.Diag.* – refere-se a data que o tumor foi diagnosticado; *TNM* – refere-se ao estágio clínico do tumor segundo a Classificação TNM; *T* – tamanho do tumor; *N* – presença de linfonodos comprometidos; *M* – presença de metástase em sítios secundários; *Linf.* – presença de linfonodos comprometidos ou não (0=negativo e 1=positivo); *N.Linf.* número de linfonodos comprometidos dentre os analisados em cada paciente; *RE* – status do receptor de estrogênio (0=negativo e 1=positivo); *RP* – status do receptor de progesterona (0=negativo e 1=positivo). A presença do número 9 em alguns quadrante representa que o parâmetro não foi analisado na paciente ou que este não se encontrava disponível no prontuário.

Das 72 amostras tumorais analisadas, 11 (15,3%) foram diagnosticadas em estágio I, 16 (22,2%) em estágio IIA, 20 (27,8%) em estágio IIB, 9 (12,5%) em estágio IIIA, 11 (15,3%) em estágio IIIB e 5 (6,9%) em estágio IV. O comprometimento de linfonodos foi avaliado nas 72 pacientes sendo que destas, 41 (56,9%) apresentaram linfonodos comprometidos. Dentre os 56 tumores avaliados para a presença dos marcadores moleculares RE e RP, 41 (73,2%) apresentaram marcação positiva para RE e 30 (53,6%) apresentaram positividade para RP (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição categórica dos Dados Clínico-Patológicos das pacientes analisadas nos ensaios de *Real-Time PCR*.

Categoria	Pacientes (%)
Estádio Clínico	
I	11 (15,3)
IIA	16 (22,2)
IIB	20 (27,8)
IIIA	9 (12,5)
IIIB	11 (15,3)
IV	5 (6,9)
Linfonodos Comprometidos	
Negativo	31 (43,1)
Positivo	41 (56,9)
Receptor de Estrógeno	
Negativo	15 (26,8)
Positivo	41 (73,2)
Receptor de Progesterona	
Negativo	26 (46,4)
Positivo	30 (53,6)

Deteção dos níveis de expressão relativa através de ensaios de *Real-Time PCR*

Os níveis de expressão relativos dos genes analisados foram detectados nas amostras de tumores primários de mama e de borda normal adjacente. Os resultados dos ensaios de *Real-Time PCR* representam os valores de um experimento realizado em duplicata. Os valores obtidos estão representados na forma de expressão gênica relativa, calculada como descrito em Materiais e Métodos, sendo que o valor tomado

como referência foi a média dos valores de Ct obtidos para as amostras de borda normais analisadas. Os genes que codificam as proteínas HPRT e β -actina foram utilizados como controle endógeno para estes ensaios. Os resultados representados são aqueles normalizados pela expressão do gene da β -actina sendo que resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se a HPRT como controle. A concentração final adequada de *primer* a ser utilizada nas reações de *Real-Time PCR* foi determinada para cada um dos pares de *primers* específicos para os genes a serem analisados. O cálculo da eficiência dos *primers* foi determinado, como descrito em Materiais e Métodos, após análise das curvas de regressão linear obtidas em condições experimentais específicas (Fig. 28 e Tabela 11).

Expressão das metaloproteinases de matriz em amostras de tumores primários de mama e de borda normal adjacente

Os níveis relativos de expressão gênica das metaloproteinases avaliadas neste estudo mostraram-se elevados nas amostras de tumores primários de mama analisadas em relação aos níveis de expressão detectados nas amostras de borda normal adjacente (Fig. 29).

Os níveis de expressão da MMP-2 e da MMP-14 detectados nas amostras tumorais apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com os níveis de expressão detectados nas amostras de borda normal ($p=0,0202$ e $p<0,0001$, respectivamente). As amostras tumorais apresentaram uma tendência de maior expressão gênica da MMP-9 quando comparadas com os níveis de expressão das amostras de borda normal ($p=0,3776$) (Tabela 12).

Figura 28: Curvas de regressão linear obtidas para determinação da eficiência dos *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica em amostras teciduais nos experimentos de *Real-Time PCR*.

Reações contendo *primers* numa concentração final determinada previamente foram realizadas utilizando como template diluições seriadas de uma mistura de cDNAs provenientes de diferentes linhagens de carcinoma mamário humano. Uma análise de regressão linear foi realizada a partir dos valores obtidos de Ct em função do logaritmo da respectiva diluição. Os coeficientes angulares das retas obtidas foram utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*.

Tabela 11: Concentração final e eficiência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente através de ensaios de *Real-Time PCR*.

PRIMER	Concentração	Coefficiente angular	Eficiência (%)
MMP-2	600nM	-3,23	104
MMP-9	200nM	-3,55	91
MMP-14	100nM	-3,87	81
TIMP-1	400nM	-3,31	101
TIMP-2	600nM	-2,92	121
RECK	600nM	-3,58	90
β -ACTINA	200nM	-3,39	97

Concentração final de primer utilizada nas reações de *Real-Time PCR*.

Coefficiente angular das regressões lineares representadas na figura 28 utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers como descrito em *Materiais e Métodos*.

Expressão dos inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz em amostras de tumores primários de mama e de borda normal adjacente

Os níveis relativos de expressão gênica dos inibidores teciduais das metaloproteinases TIMP-1 e TIMP-2 mostraram-se diminuídos nas amostras de tumores primários de mama (Fig. 29), sendo esta diminuição estatisticamente significativa quando comparados com os níveis de expressão detectados nas amostras de borda normal ($p=0,0169$ e $p<0,0127$, respectivamente) (Tabela 12).

Expressão do inibidor associado à membrana RECK em amostras de tumores primários de mama e de borda normal adjacente

As amostras de tumores primários de mama apresentaram uma tendência de expressão gênica reduzida de RECK quando comparadas com os níveis de expressão detectados nas amostras de borda normal adjacente ($p=0,0706$) (Fig. 29 e Tabela 12).

Figura 29: Análise da expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.

Níveis de expressão relativa do mRNA, após normalização pelo gene de expressão constitutiva β -actina, detectados através de ensaios de Real-Time PCR utilizando primers específicos para os genes analisados. A média dos valores de expressão relativa detectados nas bordas normais adjacentes aos tumores foi utilizada como amostra referência. Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste estatístico T de Student não pareado.

Tabela 12: Análise da expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.

GENE	BORDA vs TUMOR	Direção da alteração da expressão gênica durante o processo de tumorigênese
MMP-2	$p=0,0202$	↑
MMP-9	$p=0,3776$	↑
MMP-14	$p<0,0001$	↑
TIMP-1	$p=0,0169$	↓
TIMP-2	$p=0,0127$	↓
RECK	$p=0,0706$	↓

Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste estatístico T de Student não pareado.

Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica das metaloproteinases de matriz e seus inibidores em amostras de tumores primários de mama

A partir dos resultados de expressão gênica relativa, obtidos através da técnica de *Real-Time PCR*, foi possível analisar a existência de correlação entre os níveis de expressão dos genes das metaloproteinases de matriz MMP-2, MMP-9 e MMP-14, e os níveis de expressão dos inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-2 e do inibidor associado à membrana RECK em amostras teciduais de carcinoma mamário humano. Os resultados de expressão gênica relativa de cada um dos genes foram submetidos a análises estatísticas de Correlação de Pearson (Fig. 30 e Tabela 13).

Os níveis de expressão de RECK nas amostras tumorais apresentaram correlação positiva estatisticamente significativa com os níveis de expressão das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-14 e do inibidor tecidual TIMP-2. Desta forma, também foi possível observar a existência de uma correlação positiva estatisticamente significativa entre os níveis de expressão destes genes (Tabela 13).

Figura 30: Correlação entre os níveis de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de carcinomas primários de mama.

Níveis de expressão relativa do mRNA, após normalização pelo gene de expressão constitutiva β -actina, detectados através de ensaios de Real-Time PCR utilizando primers específicos para os genes analisados. Análises estatísticas de correlação de Pearson.

(n) Número de amostras analisadas (r) Coeficiente de correlação de Pearson

Tabela 13: Correlação entre os níveis relativos de expressão gênica de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de tumores primários de mama.

Teste de correlação de Pearson		r	p-value	n
MMP-2	MMP-9	0,0561	p=0,6523	67
	MMP-14	0,6838	p<0,0001	70
	TIMP-1	-0,1265	p=0,2968	70
	TIMP-2	0,6528	p<0,0001	70
	RECK	0,6404	p<0,0001	70
MMP-9	MMP-14	0,1742	p=0,1586	67
	TIMP-1	0,0651	p=0,6005	67
	TIMP-2	0,2072	p=0,0925	67
	RECK	0,0439	p=0,7245	67
MMP-14	TIMP-1	-0,1750	p=0,1474	70
	TIMP-2	0,6145	p<0,0001	70
	RECK	0,4919	p<0,0001	70
TIMP-1	TIMP-2	0,0573	p=0,6375	70
	RECK	-0,1336	p=0,2702	70
TIMP-2	RECK	0,4210	p=0,0003	70

Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste de correlação de Pearson.

(n) Número de amostras analisadas

(r) Coeficiente de correlação de Pearson

Balanco entre os níveis relativos de expressão gênica das metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em amostras de tumores primários de mama e de borda normal adjacente

A fim de verificar a possível ocorrência de alterações no balanço dos níveis relativos de expressão gênica enzima/inibidor entre as amostras de borda normal adjacente e as amostras de tumores primários de mama, os valores da razão enzima/inibidor foram determinados a partir dos dados obtidos nos ensaios de *Real-Time PCR* (Fig. 31). Ao determinar a razão entre os níveis de expressão das metaloproteinases analisadas em relação aos níveis de expressão do inibidor associado à membrana RECK foi possível observar que, em todos os casos, o balanço favorece a enzima nas amostras tumorais e, de modo contrário, o inibidor nas amostras de borda normal.

Figura 31: Análise do balanço proteinase / inibidor em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.

Níveis de expressão relativa do mRNA detectados através de ensaios de Real-Time PCR utilizando primers específicos para os genes analisados. Os valores representam a relação proteinase / inibidor após normalização pelo gene de expressão constitutiva β -actina. Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste estatístico T de Student não pareado.

Assim, observou-se uma diferença estatisticamente significativa das razões MMP-2/RECK, MMP-9/RECK e MMP-14/RECK entre as amostras tumorais e as amostras de borda normal analisadas ($p=0,001$, $p=0,0024$ e $p<0,0001$, respectivamente). O mesmo padrão pode ser observado ao se analisar o balanço

MMP-9/TIMP-1 e MMP-2/TIMP-2 ($p=0,0271$ e $p<0,0001$, respectivamente). A razão dos níveis de expressão da enzima MMP-14 em relação aos níveis de expressão dos inibidores teciduais analisados também apresentou o mesmo comportamento descrito anteriormente, podendo ser observada uma diferença estatisticamente significativa das razões MMP-14/TIMP-1 e MMP-14/TIMP-2 entre as amostras tumorais e as amostras de borda normal analisadas ($p=0,0012$ e $p<0,0001$, respectivamente) (Tabela 14).

Tabela 14: Análise do balanço proteinase / inibidor em amostras de tumores primários de mama e borda normal adjacente.

PROTEINASE/INIBIDOR	BORDA vs TUMOR	Direção da alteração da expressão gênica durante o processo de tumorigênese
MMP-2/TIMP-1	$p=0,2047$
MMP-2/TIMP-2	$p<0,0001$	
MMP-2/RECK	$p=0,0001$	
MMP-9/TIMP-1	$p=0,0271$	
MMP-9/TIMP-2	$p=0,0656$	
MMP-9/RECK	$p=0,0024$	
MMP-14/TIMP-1	$p=0,0012$	
MMP-14/TIMP-2	$p<0,0001$	
MMP-14/RECK	$p<0,0001$	

Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste estatístico T de Student não pareado.

Associação dos níveis relativos de expressão gênica das metaloproteinases de matriz e de seus inibidores com os dados clínico-patológicos das pacientes avaliadas

Os níveis relativos de expressão dos genes das metaloproteinases de matriz MMP-2, MMP-9 e MMP-14, e os níveis relativos de expressão dos inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-2 e do inibidor associado à membrana RECK, obtidos nos ensaios de *Real-Time PCR*, foram associados aos dados clínico-patológicos das pacientes através de análises estatísticas. A associação das variáveis qualitativas foi avaliada através do teste estatístico Qui-Quadrado.

Tabela 15

Variável	MMP-2		MMP-9		MMP-14		p-value
	baixa expressão (%)	alta expressão (%)	baixa expressão (%)	alta expressão (%)	baixa expressão (%)	alta expressão (%)	
Estádio Clínico							
I	5 (50,0)	5 (50,0)	9 (90,0)	1 (10,0)	3 (30,0)	7 (70,0)	
IIA	13 (81,2)	3 (18,8)	13 (81,2)	3 (18,8)	11 (68,8)	5 (31,2)	
IIB	10 (47,6)	11 (52,4)	17 (81,0)	4 (19,0)	9 (42,8)	12 (57,2)	
IIIA	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (100,0)	0 (0,0)	5 (62,5)	3 (37,5)	
IIIB	5 (50,0)	5 (50,0)	7 (70,0)	3 (30,0)	8 (80,0)	2 (20,0)	
IV	4 (80,0)	1 (20,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	0,170
Comprometimento de linfonodos							
Negativo	19 (63,3)	11 (36,7)	24 (80,0)	6 (20,0)	15 (50,0)	15 (50,0)	
Positivo	25 (62,5)	15 (37,5)	33 (82,5)	7 (17,5)	24 (60,0)	16 (40,0)	0,405
Receptor de Estrógeno (RE)							
Negativo	10 (66,7)	5 (33,3)	12 (80,0)	3 (20,0)	8 (53,3)	7 (46,7)	
Positivo	22 (55,0)	18 (45,0)	33 (82,5)	7 (17,5)	21 (52,5)	19 (47,5)	0,956
Receptor de Progesterona (RP)							
Negativo	12 (48,0)	13 (52,0)	19 (76,0)	6 (24,0)	11 (44,0)	14 (56,0)	
Positivo	19 (65,5)	10 (34,5)	25 (86,2)	4 (13,8)	17 (58,6)	12 (41,4)	0,284
Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste estatístico Qui-Quadrado.							

Tabela 16

Tabela 16: Relação entre os dados clínico-patológicos e o nível de expressão gênica relativa dos inibidores das MMPs detectado em ensaios de Real-Time PCR.

Variável	TIMP-1			TIMP-2			RECK		
	baixa expressão (%)	alta expressão (%)	p-value	baixa expressão (%)	alta expressão (%)	p-value	baixa expressão (%)	alta expressão (%)	p-value
Estádio Clínico									
I	8 (80,0)	2 (20,0)		4 (40,0)	6 (60,0)		5 (50,0)	5 (50,0)	
IIA	8 (50,0)	8 (50,0)		13 (81,2)	3 (18,8)		9 (56,2)	7 (43,8)	
IIB	15 (71,4)	6 (28,6)		13 (61,9)	8 (38,1)		14 (66,7)	7 (33,3)	
IIIA	4 (50,0)	4 (50,0)		5 (62,5)	3 (37,5)		5 (62,5)	3 (37,5)	
IIIB	5 (50,0)	5 (50,0)		5 (50,0)	5 (50,0)		7 (70,0)	3 (30,0)	
IV	3 (60,0)	2 (40,0)	0,518	3 (60,0)	2 (40,0)	0,398	3 (60,0)	2 (40,0)	0,936
Comprometimento de Linfonodos									
Negativo	20 (66,7)	10 (33,3)		19 (63,3)	11 (36,7)		18 (60,0)	12 (40,0)	
Positivo	23 (57,5)	17 (42,5)	0,436	24 (60,0)	16 (40,0)	0,777	25 (62,5)	15 (37,5)	0,832
Receptor de Estrógeno (RE)									
Negativo	10 (66,7)	5 (33,3)		10 (66,7)	5 (33,3)		11 (73,3)	4 (26,7)	
Positivo	22 (55,0)	18 (45,0)	0,435	24 (60,0)	16 (40,0)	0,650	22 (55,0)	18 (45,0)	0,216
Receptor de Progesterona (RP)									
Negativo	19 (76,0)	6 (24,0)		12 (48,0)	13 (52,0)		15 (60,0)	10 (40,0)	
Positivo	13 (44,8)	16 (55,2)	0,020	21 (72,4)	8 (27,6)	0,067	17 (58,6)	12 (41,4)	0,918

Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste estatístico Qui-Quadrado.

Para as análises de associação dos níveis relativos de expressão aos dados clínico-patológicos, as pacientes foram divididas em dois grupos. Considerou-se que a amostra tecidual apresentou baixa expressão do transcrito avaliado quando o nível relativo de expressão gênica detectado foi menor que o valor médio observado para todas as amostras analisadas para o gene em questão. Por outro lado, considerou-se alta expressão do transcrito para as amostras que apresentaram níveis de expressão relativa acima do valor médio detectado.

Os níveis de expressão relativa detectados para as metaloproteinases de matriz analisadas não apresentaram associações estatisticamente significativas em relação aos dados clínicos das pacientes avaliadas neste estudo (Tabela 15).

O *status* do receptor de progesterona apresentou associação estatisticamente significativa em relação ao nível de expressão relativa do inibidor tecidual de metaloproteinase, TIMP-1. Associações estatisticamente significativas não foram observadas entre os níveis de expressão relativa do inibidor tecidual TIMP-2 e RECK e as variáveis avaliadas (Tabela 16).

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTÉICA DO INIBIDOR DE METALOPROTEINASES ASSOCIADO À MEMBRANA, RECK, EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TISSUE MICROARRAY

Levantamento dos dados clínico-patológicos das pacientes incluídas no estudo

Os dados clínicos avaliados para cada uma das 236 amostras tumorais avaliadas no *Tissue Microarray* incluíram: a idade da paciente no momento do diagnóstico, o *status* hormonal, o tipo histológico do tumor, o estadiamento do tumor segundo o sistema de Classificação TNM, a presença de linfonodos comprometidos, a presença de marcadores moleculares RE (receptor de estrógeno), a ocorrência de recidivas locais e a distância, o tempo de seguimento e o tempo de sobrevida das pacientes.

Dentre as 236 pacientes analisadas, a média de idade no momento do diagnóstico da doença foi de 55,4 anos. O *status* hormonal foi avaliado em amostras de 233 pacientes das quais 142 (60,9%) eram menopausadas. A média de tempo de seguimento foi de 73 meses.

Das 236 amostras tumorais analisadas, 220 (93,2%) foram diagnosticadas como carcinoma ductal invasivo, 13 (5,5%) como carcinoma lobular invasivo e 3 (1,3%) como carcinoma papilífero. Dentre as pacientes avaliadas, 5 (2,1%) foram diagnosticadas em estágio I, 32 (13,6%) em estágio IIA, 42 (17,8%) em estágio IIB, 38 (16,1%) em estágio IIIA, 78 (33,0%) em estágio IIIB e 41 (17,4%) em estágio IV. O comprometimento de linfonodos foi avaliado para todas pacientes sendo que 176 (74,6%) apresentaram linfonodos comprometidos. Em relação aos marcadores moleculares analisados, 235 tumores foram avaliados para a presença de RE sendo que destes, 118 (50,2%) apresentaram marcação positiva. (Tabela 17).

Tabela 17: Distribuição categórica dos Dados Clínico-Patológicos das pacientes incluídas no *Tissue Microarray*

<i>Categoria</i>	<i>Pacientes (%)</i>
Estádio Clínico	
I	5 (2,1)
IIA	32 (13,6)
IIB	42 (17,8)
IIIA	38 (16,1)
IIIB	78 (33,0)
IV	41 (17,4)
Linfonodos	
Comprometidos	
Negativo	60 (25,4)
Positivo	176 (74,6)
Receptor de	
Estrógeno	
Negativo	117 (49,8)
Positivo	118 (50,2)
Status Hormonal	
Pré-menopausal	91 (39,1)
Pós-menopausal	142 (60,9)

Deteção dos níveis de expressão protéica de RECK

Para o estudo imunohistoquímico de RECK foram utilizadas seis lâminas não consecutivas havendo, portanto, um total de seis amostras avaliadas para cada um dos casos. A partir da avaliação imunohistoquímica das lâminas determinou-se um *score* para a intensidade da marcação (0-3) e um *score* para a percentagem de células marcadas (0-4) em cada uma das amostras (Fig. 32). A classificação final de um caso quanto à positividade de RECK foi obtida após cruzamento dos dados referentes aos *scores* estabelecidos. Desta forma, foram determinados valores para os níveis de expressão protéica do inibidor associado à membrana, RECK, expresso em unidades arbitrárias, correspondentes ao *score* médio das seis amostras avaliadas para cada caso.

Para associação do nível de expressão protéica de RECK com os dados clínico-patológicos das pacientes, estas foram previamente classificadas de acordo com os valores obtidos a partir da avaliação imunohistoquímica das lâminas. Casos nos quais a soma dos *scores* médios (intensidade e percentagem) resultou em valores menores que 1 foram considerados negativos para a marcação. Considerou-se positivo fraco e positivo forte casos que apresentaram valores de soma dos *scores* médios entre 1 e 5 e maiores que 5, respectivamente. A associação das variáveis qualitativas e as análises de sobrevida foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos.

Figura 32: Detecção dos níveis de expressão protéica de RECK em amostras de tumores primários de mama.

Reação imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-hRECK. (A) Campo representativo da lâmina de Tissue array contendo 236 amostras de tumores primários de mama e 10 amostras de tecido mamário normal (10x). (B) Micrografia demonstrando reação de intensidade fraca em pequena porção das células (100x). (C) e (D) Micrografias demonstrando expressão forte e difusa de RECK nas células tumorais (C, 100x; D, 200x).

Os níveis de expressão protéica de RECK não apresentaram associação estatisticamente significativa em relação aos dados clínicos avaliados para as pacientes incluídas neste estudo (Tabela 18). No entanto, pudemos observar que uma porcentagem elevada das amostras provenientes de pacientes em estágio clínico avançado apresentou marcação positiva forte para RECK quando comparadas com amostras provenientes de estádios clínicos precoces. Classificando-se as amostras em apenas dois grupos, marcação negativa ou positiva fraca e marcação forte para RECK, a associação observada é estatisticamente significativa ($p=0,0245$). Além disso, amostras de pacientes com marcação positiva forte para RECK apresentaram

uma tendência de menor tempo de sobrevida global em relação às amostras nas quais foi detectada marcação negativa ou positiva fraca ($p=0,06$) (Fig. 33).

Tabela 18: Relação entre os dados clínico-patológicos e o nível de expressão protéica de RECK detectado em ensaios de *Tissue Microarray*.

Variável	Negativo	RECK		p-value
		Positivo Fraco	Positivo Forte	
	Pacientes (%)			
Estádio Clínico				
I	3 (60,0)	0 (0,0)	2 (40,0)	
II	38 (51,3)	21 (28,4)	15 (20,3)	
III	57 (49,1)	28 (24,2)	31 (26,7)	
IV	13 (31,7)	9 (22,0)	19 (46,3)	0,084
Comprometimento de linfonodos				
Negativo	31 (51,7)	15 (25,0)	14 (23,3)	
Positivo	80 (45,5)	43 (24,4)	53 (30,1)	0,578
Receptor de Estrógeno (RE)				
Negativo	62 (53,0)	26 (22,2)	29 (24,8)	
Positivo	49 (41,5)	32 (27,1)	37 (31,4)	0,211
Status Hormonal				
Pré-menopausal	41 (45,0)	23 (25,3)	27 (29,7)	
Pós-menopausal	68 (47,9)	34 (23,9)	40 (28,2)	0,915

Valores de p obtidos após submissão dos dados ao teste estatístico Qui-Quadrado.

Figura 33: Curva de Sobrevida Global das pacientes incluídas no estudo da expressão protéica de RECK através de ensaios de *Tissue Microarray*.

Análises de sobrevida obtidas pelo método de Kaplan-Meier e teste estatístico de Logrank. Amostras classificadas em apenas dois grupos, marcação negativa ou positiva fraca e marcação forte para a proteína RECK.

6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é a doença maligna que mais acomete as mulheres. Este tipo de câncer se inicia como uma doença localizada porém capaz de metastizar para linfonodos e órgãos distantes. Metástases de carcinoma de mama são estabelecidas em diferentes órgãos sendo os sítios comuns de disseminação metastática: osso, pulmão, fígado e cérebro (Lee, 1983; Steeg, 2005). A principal causa de morte para pacientes com câncer de mama não está relacionada ao tumor primário, mas sim à ocorrência de metástase em sítios distantes. No diagnóstico primário, marcadores de prognóstico são utilizados na determinação da transição para uma doença sistêmica. No entanto, novos marcadores moleculares são necessários para a identificação de pacientes que apresentam alto risco de surgimento de metástases, o que irá permitir o desenvolvimento de estratégias individuais de tratamento.

O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea. Aproximadamente 10-15% das pacientes apresentam uma doença agressiva e desenvolvem metástase dentro de um período de três anos após a detecção inicial do tumor primário. No entanto, a manifestação de metástase em órgãos distantes 10 anos ou mais após o diagnóstico inicial não é um fato incomum. Desta forma, pacientes com câncer de mama apresentam risco de desenvolvimento de metástases durante todo o seu período de vida. A natureza heterogênea da metástase do câncer de mama dificulta não apenas a cura da doença, mas também a determinação de seus fatores de risco.

O entendimento da Biologia, da Bioquímica e dos mecanismos moleculares da expansão do câncer de mama irá auxiliar na prevenção da metástase e no desenvolvimento de tratamentos específicos para aquelas metástases já estabelecidas, numa tentativa de aumentar a taxa de sobrevivência das pacientes (Weigelt et al., 2005; Welch et al., 2000).

Células epiteliais adquirem fenótipo maligno durante uma fase inicial de crescimento da lesão *in situ*, a qual encontra-se delimitada por uma camada de matriz extracelular. A degradação da MEC é um evento chave no processo metastático e representa a transição de uma lesão *in situ* para um tumor epitelial maligno invasivo, o qual apresenta propensão à metástase.

O processo de metástase consiste em uma complexa cascata de etapas organizadas, seqüenciais e relacionadas, incluindo: invasão tecidual local, entrada das células tumorais no sistema circulatório sanguíneo ou linfático (intravasamento), disseminação e colonização de um sítio secundário do ambiente hospedeiro (extravasamento). Assim, as etapas iniciais do processo metastático envolvem a dispersão das células tumorais, após aquisição de motilidade, e a degradação da matriz extracelular (MEC) mediada por enzimas proteolíticas (Chambers et al., 2002; Garbett et al., 2000; Liotta et al., 1991b; Weigelt et al., 2005). A síntese, a secreção e a atividade catalítica das proteinases estão sob rígida regulação sendo a maioria secretada na forma de zimogênios inativos (Sternlicht & Werb, 2001). Potentes inibidores naturais das proteinases são responsáveis por limitar a duração da atividade de proteólise. Em condições fisiológicas, o balanço entre a degradação proteolítica e a inibição regulada da proteólise controla eventos proteolíticos normais como o remodelamento tecidual. No entanto, em certos processos patológicos, incluindo o câncer, o balanço entre a regulação negativa e a proteólise ativa é perdido, favorecendo o processo de invasão do tecido hospedeiro e a metástase tumoral (Clavel et al., 1992).

Visando um melhor entendimento da biologia da metástase do câncer de mama, o presente estudo teve como objetivo inicial avaliar o perfil de expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores, os inibidores teciduais (TIMPs) e o inibidor associado à membrana, RECK, em modelo celular de progressão tumoral de carcinoma de mama humano. Esta análise foi abordada experimentalmente

através da seleção de um modelo celular e da detecção dos níveis de expressão gênica através de ensaios de *Real-Time PCR*.

Durante muitos anos, a maioria dos estudos em transformação neoplásica teve como foco a unidade célula. No entanto, em órgãos como a mama, a homeostase celular é determinada conjuntamente através de interações estabelecidas entre células epiteliais e o estroma adjacente (Tlsty & Hein, 2001). O estroma é composto por um tipo específico de MEC e por componentes celulares como fibroblastos e células do sistema imune (Mueller & Fusenig, 2004). A MEC é capaz de influenciar o comportamento celular modulando vias de sinalização envolvidas no controle da proliferação, sobrevivência e morfogênese celular (Lukashev & Werb, 1998). Desta forma, a modulação do ambiente estromal por células tumorais pode induzir mudanças morfológicas e alteração da expressão gênica. A expressão aumentada de enzimas proteolíticas pelas células tumorais está diretamente relacionada com a modulação do microambiente (Mueller & Fusenig, 2004; Tlsty & Hein, 2001).

Apesar das evidências de que as interações célula-célula e célula-MEC definem o contexto tecidual e exercem um papel crucial na regulação da homeostase, condições de cultura 2D (superfície sólida) são utilizadas na maioria dos estudos envolvendo linhagens celulares. No entanto, diversos estudos em modelo de câncer de mama têm observado diferenças significativas na morfologia e no perfil global de expressão gênica dependente do contexto (Bissell et al., 2002; Ip & Darcy, 1996; Perou et al., 2000; Ross et al., 2000). O crescimento de células epiteliais de mama em matriz tridimensional otimiza a transdução de sinal entre proteínas extracelulares, receptores de superfície celular e estruturas nucleares mimetizando, de maneira mais apropriada, a situação *in vivo* (Birgersdotter et al., 2005; Bissell et al., 2002). Desta forma, sistemas utilizando modelos com a finalidade de reproduzir o microambiente *in vivo* tem sido a melhor opção na descoberta de mecanismos moleculares responsáveis pelo controle da progressão do câncer de mama.

Assim, considerando o fato das células tumorais potencialmente invasivas estarem em contato com a membrana basal *in vivo* e a importância do contexto na modulação de processos celulares, a caracterização do modelo celular estabelecido e a análise do perfil de expressão gênica foram realizados mantendo-se as linhagens celulares sobre membrana basal reconstituível (MATRIGEL™).

O MATRIGEL™ corresponde a uma preparação de membrana basal reconstituída extraída de sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), tumor rico em proteínas da MEC. O componente principal é a laminina, seguido por colágeno IV, proteoglicanos heparan sulfato, entactina e nidogênio. Diversos fatores de crescimento estão presentes na preparação incluindo TGF- β , FGF e ativadores de plasminogênio. Em condições fisiológicas normais, o MATRIGEL™ polimeriza produzindo uma matriz biologicamente ativa e eficaz para a adesão e diferenciação celular (BD, Technical Bulletin).

Estabelecimento do modelo celular de progressão tumoral de câncer de mama

Para o estabelecimento de um modelo de progressão tumoral foi selecionado um painel de linhagens celulares de carcinoma mamário humano partindo-se de uma linhagem de baixa capacidade invasiva e não metastática, numa progressão contínua, até uma linhagem altamente invasiva e que apresenta propensão à metástase. A seleção das linhagens celulares foi baseada em estudos prévios que haviam realizado a caracterização destas linhagens (Lacroix & Leclercq, 2004; Price et al., 1990; Thompson et al., 1992).

Muitas linhagens celulares estão em cultura há anos ou até mesmo décadas sofrendo uma forte pressão seletiva *in vitro*. Dado que as linhagens encontram-se distribuídas em inúmeros laboratórios, a mesma linhagem celular pode sofrer etapas diferentes de seleção de acordo com as técnicas de manutenção utilizadas

(Birgersdotter et al., 2005). Desta forma, a fim de verificar se as linhagens celulares disponíveis no laboratório mantinham as características avaliadas na seleção, as quais poderiam ter sido afetadas pelas diferenças nas condições de manutenção das culturas celulares e pelo uso de passagens ou subclones diferentes na realização dos experimentos, foram realizados ensaios para avaliar a capacidade invasiva e metastática. Além disso, visando uma melhor caracterização do modelo, outros parâmetros, como morfologia e taxa de proliferação celular, também foram avaliados.

Ensaio de invasão *in vitro* utilizando elementos de membrana basal reconstituível (MATRIGEL™) como substrato para invasão, têm sido amplamente utilizados para discriminação entre células invasivas e não invasivas, sendo que os resultados correlacionam com o potencial invasivo da linhagem celular *in vivo* (Kramer et al., 1986; Terranova et al., 1986). Utilizando esta metodologia, que foi a mesma utilizada nos estudos prévios de caracterização das linhagens, pudemos observar que as linhagens celulares previamente caracterizadas como de fenótipo agressivo (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) apresentaram maior capacidade migratória e alta capacidade invasiva quando comparadas com as linhagens celulares MCF-7 e ZR-75-1 submetidas às mesmas condições. Desta forma, através da mesma abordagem, foi possível verificar que as linhagens celulares disponíveis no laboratório mantinham as diferenças de potencial invasivo descritas previamente.

O potencial metastático das linhagens celulares foi avaliado através de ensaios *in vitro* de formação de colônia em meio semi-sólido e ensaios *in vivo* de metástase experimental em pulmão em camundongos imunodeficientes do tipo *nude*.

Estudos anteriores indicam que a capacidade de crescimento independente de ancoragem de linhagens celulares humanas de carcinoma tumoral de mama em agarose dura (0,9%) é capaz de discriminar as células capazes de produzir metástase experimental em camundongos *nude* (Li et al., 1989). A linhagem celular MDA-MB-435, caracterizada com uma linhagem de alto potencial invasivo, apresentou

capacidade de formação de colônias em agarose dura (0,9%). Por outro lado, a linhagem celular MCF-7, a qual não apresenta potencial metastático em ensaios *in vivo*, apresentou uma drástica redução do número de colônias formadas em agarose dura (0,9%), quando comparada com o crescimento em agarose mole (0,3%), condição relacionada com potencial tumorigênico. As demais linhagens celulares analisadas não apresentaram capacidade de crescimento independente de ancoragem.

Observou-se, portanto, que os resultados obtidos *in vitro* corroboram os dados de (Li et al., 1989) sendo possível o estabelecimento de uma correlação entre a capacidade de crescimento de células tumorais em diferentes concentrações de agarose com a capacidade proliferativa destas células *in vivo* em sítios específicos de metástase, dado que os resultados obtidos correlacionam com aqueles obtidos previamente através de ensaios *in vivo*. As bases biológicas desta correlação ainda não foram esclarecidas.

É importante ressaltar que a capacidade proliferativa de células tumorais em diferentes concentrações de agarose não correlaciona com etapas do processo metastático que não envolvem divisão celular, como a produção de enzimas degradativas ou a habilidade de escapar do sistema imune do hospedeiro. Células que apresentam capacidade proliferativa independente de ancoragem e que são incapazes de penetrar e sobreviver na circulação sistêmica não irão completar a cascata metastática, mas apresentam capacidade de formação de colônia nos ensaios realizados. Além disso, outras abordagens para análise do mesmo parâmetro devem ser levadas em conta dado que algumas linhagens celulares não apresentam capacidade de formar colônias em meio semi-sólido, impossibilitando a caracterização através deste tipo de ensaio.

In vivo, o processo de metástase pode ser avaliado experimentalmente através de ensaios nos quais as células tumorais são injetadas ortotópica ou diretamente na

circulação de animais experimentais. Estes ensaios são chamados, respectivamente, de metástase espontânea e metástase experimental. Em ambos os casos, a etapa final do ensaio consiste na formação de metástases visíveis em sítios secundários. Estudos prévios haviam caracterizado as linhagens celulares selecionadas quanto ao potencial metastático através de ensaios de metástase espontânea (Thompson et al., 1992). No presente estudo, as linhagens celulares foram caracterizadas através de ensaios de metástase experimental, o qual avalia as etapas tardias do processo metastático. Um maior número de colônias foi detectado nos pulmões dos camundongos injetados com células previamente caracterizadas como sendo de alta capacidade metastática.

Considerando-se os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, pudemos observar que as linhagens celulares MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T apresentam maior tendência à propensão metastática, quando comparadas com as linhagens MCF-7 e ZR-75-1, o que corrobora, através da avaliação de diferentes etapas do processo metastático, os dados a partir dos quais as linhagens foram selecionadas para este estudo.

Caracterização morfológica do modelo celular

Na caracterização morfológica das linhagens celulares plaqueadas em substrato plástico foi possível estabelecer uma relação entre perda de diferenciação e aquisição de capacidade invasiva e propensão à metástase, dado que as linhagens de fenótipo fibroblastóide correspondiam àquelas previamente descritas como sendo de fenótipo agressivo, apresentando maior potencial invasivo e metastático em relação às linhagens de fenótipo epitelióide.

As linhagens celulares menos agressivas (MCF-7 e ZR-75-1) retêm características morfológicas de epitélio luminal de mama diferenciado, crescendo na forma de colônias interconectadas de células poligonais, enquanto que as linhagens

celulares de fenótipo agressivo (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) apresentaram fenótipo menos diferenciado, caracterizado por células de morfologia mais próxima da fibroblastóide do que da epitelióide.

Quando plaqueadas sobre camada de MATRIGEL™ as linhagens adquiriram morfologia de célula migratória, fenótipo evidenciado pela observação de prolongamentos celulares. As linhagens celulares MCF-7 e ZR-75-1 apresentaram células mais dispersas, quando comparadas com os agrupamentos celulares observados na condição sem revestimento. Estruturas especializadas de superfície celular, compostas por uma rede de microfilamentos estão envolvidas no crescimento de células tumorais sobre elementos da MEC e na invasão do substrato. Na região da membrana celular onde tais estruturas são formadas ocorre uma concentração de vesículas de secreção contendo MMP-2 e MMP-9 além da *clusterização* de proteínas integrais de membrana como MMPs do tipo membrana (MT-MMP), o que facilita o direcionamento da proteólise da MEC durante a migração e especialmente durante a invasão tumoral (Foda & Zucker, 2001).

Quando as mesmas linhagens foram submetidas ao crescimento em matriz tridimensional, para as linhagens de fenótipo menos agressivo, pudemos observar a formação de colônias nas quais os limites celulares não foram visualizados, sendo que as células pareciam fusionadas. Para linhagens de caráter agressivo foi possível a distinção dos limites entre as células, as quais adquiriram uma morfologia esférica. A linhagem Hs578T quando plaqueada em MATRIGEL™ apresentou aumento do número de prolongamentos celulares, fenótipo mais acentuado na condição de crescimento em matriz tridimensional.

A plasticidade de células epiteliais e a perda de diferenciação são um marco na progressão maligna durante as fases invasivas e metastáticas. Nas etapas iniciais do processo metastático, as células tumorais sofrem alterações morfológicas, evento denominado transição epitélio-mesênquima (EMT) que envolve perda da polaridade,

perda do contato com células vizinhas e a subsequente dispersão após aquisição de motilidade. A EMT envolve desarranjo de junções aderentes e desmossomos bem como a reorganização dos complexos celulares de adesão ao substrato. Após perda de polaridade, o citoesqueleto é significativamente remodelado. A substituição do filamento intermediário de citoqueratina por vimentina é considerado um importante critério na ocorrência da EMT (Petersen et al., 2001; Savagner, 2001; Thiery, 2003; Vincent-Salomon & Thiery, 2003). Desta forma, tendo como base a caracterização morfológica, as linhagens celulares selecionadas encontram-se distribuídas ao longo de um espectro de diferenciação desde o fenótipo epitelial até um fenótipo mesenquimal. O fenótipo mesenquimal apresentado pelas linhagens celulares de alto potencial invasivo e metastático (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T) pode ser o resultado da ocorrência da EMT no tumor de mama (Pulyaeva et al., 1997). Estudos prévios de análise do padrão de expressão gênica de marcadores associados com fenótipo epitelial, como por exemplo, a citoqueratina, e daqueles relacionados com o fenótipo mesênquimal, como por exemplo, a vimentina, em linhagens celulares de câncer de mama corroboram os resultados observados para o modelo selecionado e indicam que as células utilizadas não diferenciaram com as passagens e estão sendo mantidas em condições adequadas de cultura. De modo geral, células de câncer de mama de morfologia epitelial expressam citoqueratina e apresentam baixo potencial invasivo, enquanto que a expressão de vimentina e outros marcadores foi detectada apenas nas linhagens de caráter mais agressivo, que apresentam uma morfologia mais próxima da fibroblastóide (Gordon et al., 2003; Lacroix & Leclercq, 2004).

Caracterização do potencial proliferativo do modelo célula

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de proliferação, nenhuma diferença significativa pode ser observada quando comparou-se o tempo de dobramento das diferentes linhagens celulares cultivadas sobre o mesmo substrato. Tal fato sugere

uma ausência de correlação entre a aquisição de capacidade invasiva e metastática e a aquisição de vantagem proliferativa nas linhagens celulares de carcinoma de mama humano analisadas. Na condição de plaqueamento das linhagens celulares sobre MATRIGEL™ não observamos diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de dobramento obtido para o cultivo das linhagens em plástico, sugerindo que os elementos de matriz presentes no MATRIGEL™ não exercem papel no controle da proliferação celular destas linhagens.

Os resultados de densidade de saturação mostram que não existe diferença significativa quando as linhagens celulares são cultivadas nos diferentes substratos, plástico e MATRIGEL™, sugerindo que não existe papel dos elementos de matriz presentes no MATRIGEL™ na regulação da sinalização de parada de crescimento por contato célula-célula. Quando comparamos a densidade de saturação das diferentes linhagens entre si, para um mesmo substrato, podemos observar diferenças estatisticamente significativas. No entanto, não é possível estabelecer uma correlação entre a diferença no valor da densidade de saturação com os parâmetros previamente analisados como taxa de proliferação celular e potencial invasivo e metastático, dado que linhagens celulares de características semelhantes apresentam valores significativamente diferentes de densidade de saturação.

As interações célula-MEC são essenciais na regulação do fenótipo de um grande número de células. Proteínas da matriz exercem influência no crescimento, na morfogênese e na diferenciação de células epiteliais. As células epiteliais interagem com moléculas da matriz através de receptores de superfície celular, incluindo aqueles da família das integrinas. Existem evidências de que proteínas da matriz e seus receptores, as integrinas, são importantes para o desenvolvimento e a diferenciação de células epiteliais de mama. No entanto, existem poucos relatos a respeito da influência das proteínas da MEC na proliferação de células de mama (Woodward et al., 1998).

O componente majoritário da MEC no tecido mamário é a fibronectina, elemento essencial para o desenvolvimento normal, capaz de promover a proliferação celular em modelos experimentais (Hynes, 1994; Wary et al., 1996). Desta forma, a ausência de alteração da taxa de proliferação quando as células de mama foram plaqueadas sobre MATRIGEL™ pode estar relacionada com a composição do substrato. A análise do plaqueamento das linhagens celulares sobre diferentes elementos de matriz como, por exemplo, fibronectina, permitiria uma melhor avaliação do papel da MEC na proliferação celular destas linhagens.

De modo geral, considerando-se todos os resultados obtidos na etapa de caracterização, as linhagens celulares analisadas podem ser divididas, basicamente, em dois grupos. Um primeiro grupo, no qual as linhagens celulares MCF-7 e ZR-75-1 estariam inseridas, sendo representativo de linhagens celulares que apresentam expressão de marcadores típicos de células luminais epiteliais de mama, crescimento como colônias interconectadas de células poligonais em plástico e como colônias fusionadas em MATRIGEL™, baixo potencial invasivo em ensaios de quimioinvasão e que não apresentam propensão à metástase quando injetadas em camundongo *nude*. Um segundo grupo, no qual as linhagens MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T estariam inseridas, que é representativo de linhagens celulares que apresentam fenótipo fibroblastóide em plástico e crescimento como colônias não fusionadas ou como colônias celulares com prolongamentos estrelados em MATRIGEL™, alta capacidade invasiva e propensão à metástase e que expressam altos níveis de expressão de vimentina, um marcador de células mesenquimais. A aquisição de capacidade invasiva e metastática e a aquisição de vantagem proliferativa parecem ser eventos que ocorrem de maneira independente durante a progressão maligna, não sendo possível a distinção das linhagens celulares analisadas com base nos parâmetros de proliferação.

Assim, as linhagens celulares selecionadas representam diferentes estágios do câncer de mama e fornecem um modelo para estudo das alterações morfológicas e moleculares que ocorrem na progressão metastática.

Níveis de expressão gênica das MMPs e a progressão tumoral em modelo celular

Na glândula mamária normal, a expressão constitutiva das MMPs é baixa, exceto durante os períodos de desenvolvimento, gravidez e involução (Benaud et al., 1998). No entanto, em processos patológicos, como no câncer de mama, níveis elevados de MMPs são detectados nas células tumorais e nas células normais do tecido adjacente ao tumor. Dada a capacidade de degradar o colágeno IV, principal componente da membrana basal, a MMP-2 e a MMP-9 estão relacionadas com a disseminação do câncer. A MMP-14 (MT1-MMP), através da ativação da pró-MMP-2, apresenta um papel importante na progressão do câncer de mama.

De modo geral, as células tumorais modificam o ambiente estromal produzindo enzimas proteolíticas. O remodelamento da MEC cria um ambiente pró-invasivo e pró-migratório. Além disso, a degradação de moléculas da MEC expõe domínios protéicos crípticos e gera novos fragmentos, os quais podem ter funções pró- e anti-angiogênicas. Na MEC remodelada, as MMPs ativam fatores de crescimento de superfície celular e aqueles ligados à matriz contribuindo para o *crosstalk* entre o microambiente e as células tumorais (Mueller & Fusenig, 2004).

No modelo de progressão tumoral de carcinoma mamário humano utilizado neste estudo, pudemos observar que a aquisição do fenótipo invasivo e metastático está diretamente relacionado com aumento dos níveis de expressão gênica das MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP) e da atividade proteolítica das Gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente).

A expressão e a atividade da maioria das MMPs em modelos celulares de câncer de mama correlaciona com comportamento biológico mais agressivo

(Bachmeier et al., 2005; Bachmeier et al., 2001; Balduyck et al., 2000; Haupt et al., 2006; Kousidou et al., 2004). No entanto, existem poucos relatos analisando mais de uma MMP em diferentes linhagens celulares (Bachmeier et al., 2001) enquanto que muitos estudos analisam os níveis de expressão de apenas uma ou de algumas MMPs em uma linhagem celular isolada (Azzam et al., 1993; Balduyck et al., 2000). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP) são super expressas em uma ou mais linhagens tumorais analisadas, no entanto, diferentes MMPs parecem exercer um papel chave na capacidade invasiva de cada uma das linhagens através de membranas basais. Desta forma, os resultados sugerem a complexidade do sistema das MMPs e deixam claro que a investigação de apenas uma MMP ou de apenas uma linhagem celular não permite a obtenção de informações suficientes para a elucidação dos mecanismos patológicos da proteólise associada ao tumor.

Alguns trabalhos sugerem que as MMPs são produzidas exclusivamente pelo estroma adjacente ao tumor e não pelas células tumorais. No entanto, os resultados obtidos corroboram os dados de outros autores (Balduyck et al., 2000; Bartsch et al., 2003; Lebeau et al., 1999) e demonstram que as MMPs analisadas são expressas em linhagens tumorais de câncer de mama mantidas em plástico, um ambiente completamente isolado de componentes estromais.

Apesar das evidências de que as células produzem MMPs sem a necessidade da ativação por fibroblastos do estroma (Garbett et al., 2000; Lebeau et al., 1999), devemos considerar que a situação *in vivo* é muito mais complexa, dado que células do estroma são capazes de produzir MMPs. Células tumorais e células do estroma adjacente expressam MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP) (John & Tuszynski, 2001), sugerindo que ambos os componentes celulares contribuem para a cascata metastática. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram que as linhagens celulares

MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Hs578T são capazes de influenciar a expressão gênica das MMPs no estroma adjacente (Haupt et al., 2006).

Variações significativas podem ser observadas quanto aos níveis de expressão das MMPs detectados nas linhagens celulares entre os diferentes trabalhos. Tais variações podem ser resultado das diferentes condições de cultura bem como de diferenças na composição do soro adicionado ao meio de cultura, dado que fatores de crescimento presentes no soro são capazes de regular a expressão das MMPs.

Estudos prévios demonstraram que a expressão de MMPs por células tumorais é influenciada por diversos fatores ambientais incluindo fatores de crescimento e elementos da MEC (Benaud et al., 1998). Interações entre receptores de integrinas e elementos da MEC são capazes de regular a expressão das MMPs (Bartsch et al., 2003).

No presente estudo, a exposição das células a elementos de matriz extracelular (MATRIGEL™) resultou em alterações significativas dos níveis de transcritos e atividade das MMP-2 e MMP-9 quando comparados com os níveis detectados quando as mesmas linhagens foram mantidas em plástico. A análise foi realizada em dois períodos de cultivo das células: 3 dias, período no qual as células estão aderidas à superfície do MATRIGEL™, e 5 dias, período no qual as células que apresentam capacidade invasiva invadem o substrato. Os níveis de expressão gênica foram, na maioria das vezes, suprimidos pelo plaqueamento das células sobre MATRIGEL™. Os resultados obtidos não apresentaram correlação com o tempo de cultivo das células sobre o substrato. Por outro lado, a atividade de proteólise das MMP-2 e MMP-9 foi aumentada pelo plaqueamento das células sobre MATRIGEL™. Desta forma, no modelo utilizado, o aumento da atividade proteolítica parece ser independente da ativação transcricional. Estudos anteriores verificaram a ativação da MMP-2, independente da produção da protease, quando as mesmas linhagens foram cultivadas sobre gel de colágeno I. Além disso, a ativação da MMP-2 mostrou-se

dependente de síntese protéica, sendo esta inibida por ciclohexemida (Azzam et al., 1993).

É importante ressaltar, como discutido previamente, que o plaqueamento da células sobre outros elementos de matriz ou sobre outra combinação de elementos permitiria uma melhor avaliação dos componentes da MEC na regulação da expressão gênica.

Níveis de expressão gênica dos TIMPs e a progressão tumoral em modelo celular

Ao analisar o perfil de expressão gênica dos inibidores de MMPs observamos que altos níveis de expressão gênica dos TIMPs e de RECK correlacionam com fenótipos de caráter invasivo e metastático, semelhante aos resultados obtidos para as MMPs. Da mesma forma, níveis elevados de expressão gênica de TIMP-1 e de TIMP-2 foram detectados previamente em linhagens celulares de câncer de mama de alto potencial invasivo e metastático (Bachmeier et al., 2005; Kousidou et al., 2004; Yoshiji et al., 1996), resultados inesperados se considerarmos que os TIMPs são inibidores das MMPs.

Níveis elevados de expressão gênica dos TIMPs podem refletir o intenso remodelamento da MEC, característica de fenótipo invasivo. Assim, a indução da expressão gênica dos TIMPs estaria associada a um mecanismo de resposta celular ao aumento dos níveis de expressão e atividade das MMPs. Neste caso, os TIMPs, atuando como inibidores das MMPs, seriam expressos numa tentativa de manter a homeostase da MEC através do equilíbrio MMP/TIMP, evitando intensa proteólise tecidual. Durante o processo invasivo, os TIMPs são produzidos principalmente pelas células tumorais e podem atuar como mecanismo regulatório da atividade das MMPs produzidas pelas células estromais e pelas células tumorais. Desta forma, as células tumorais teriam um papel chave na determinação de quando e de onde invadir (Chang & Werb, 2001).

Por outro lado, a caracterização dos TIMPs como proteínas multifuncionais capazes de induzir a proliferação e inibir a apoptose em células tumorais, sugere que os TIMPs podem atuar na progressão, mais do que na supressão do tumor. Desta forma, o papel do aumento da expressão dos TIMPs em linhagens mais invasivas e metastáticas estaria relacionado com a ativação, e não com inibição, da atividade das MMPs através da formação de complexos com as pró-MMPs, contribuindo para a aquisição de fenótipos agressivos. Além disso, os TIMPs podem exercer atividades promotoras da progressão tumoral de maneira independente das MMPs. TIMP-1 é capaz de se ligar à superfície da linhagem de carcinoma de mama MCF-7, podendo ser internalizado para o núcleo destas células, sugerindo que TIMP-1 é capaz de influenciar funções nucleares como replicação e/ou transcrição (Ritter et al., 1999).

O conceito de que inibidores de proteases que degradam a matriz podem possuir um efeito estimulatório durante a progressão tumoral, prevalecendo sobre o efeito inibitório, foi previamente demonstrado para um inibidor de serina protease, o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1). Altos níveis de PAI-1 têm sido descritos em estágios avançados do câncer de mama (Foekens et al., 1994).

Assim, considerando a complexidade de mecanismos pelos quais os TIMPs são capazes de controlar a atividade das MMPs, é esperado que a simples detecção dos níveis de TIMP não prediz a habilidade de uma célula tumoral invadir ou metastizar.

As variações dos níveis de expressão gênica dos TIMPs entre as linhagens de fenótipo agressivo demonstram, como no caso das MMPs, que o processo invasivo envolve a ação de diversas proteases e seus inibidores, sendo que o estudo de um conjunto dessas moléculas em diferentes linhagens celulares possibilita uma visão mais abrangente do potencial proteolítico de células tumorais.

Em algumas das diferentes condições analisadas, o plaqueamento das células sobre elementos de matriz extracelular resultou em aumento significativo dos níveis

relativos de expressão gênica dos TIMPs quando comparados com os níveis detectados em células mantidas sobre plástico. Estes resultados sugerem que elementos de matriz extracelular presentes no MATRIGEL™ podem exercer influência sobre o controle transcricional da expressão dos TIMPs. Além disso, a indução da expressão gênica dos TIMPs pode ser o resultado da intensa proteólise do MATRIGEL™, dado que tal fato pode ser observado apenas para as linhagens celulares de alto potencial invasivo e metastático, as quais apresentam elevada atividade proteolítica.

Níveis de expressão gênica de RECK e a progressão tumoral em modelo celular

O gene supressor de metástase RECK é capaz de inibir a atividade proteolítica das MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP) inibindo, assim, a invasão, metástase e angiogênese tumoral (Oh et al., 2001; Sasahara et al., 2002; Takahashi et al., 1998). A identificação de um inibidor de MMP associado à célula, que está envolvido na regulação do processamento e da secreção das MMPs, demonstra a existência de moduladores *upstream* da homeostase da MEC. RECK, associado à membrana estaria atuando como regulador *upstream* da atividade das MMPs, enquanto que os TIMPs atuariam como reguladores *downstream*. No modelo celular analisado, o gene RECK apresentou-se mais expresso nas linhagens de câncer de mama com fenótipo de caráter invasivo e metastático, semelhante aos resultados obtidos para os inibidores endógenos das MMPs.

O aumento dos níveis de expressão de RECK, de maneira semelhante aos TIMPs, pode estar associado a um mecanismo de resposta celular ao aumento dos níveis de expressão das MMPs, sendo que RECK, dada sua localização na membrana plasmática, estaria efetivamente regulando os eventos proteolíticos locais da superfície celular, onde o processamento proteolítico das MMPs ocorre.

Além disso, devemos considerar a possibilidade de RECK atuar como proteína multifuncional, exercendo uma atividade promotora de tumor nas linhagens de caráter mais agressivo. Resultados recentes, obtidos em nosso laboratório, sugerem que apesar de sua localização na membrana das células, RECK induz sinais intracelulares envolvidos na regulação de atividades celulares importantes como o controle da proliferação celular (Winnischofer et al., manuscrito em preparação). Os mecanismos pelos quais esta sinalização ocorre ainda não foram elucidados.

Recentemente, outras funções têm sido sugeridas para a proteína RECK. Balsas lipídicas têm sido relacionadas como domínios reguladores de membrana que participam de diversos processos celulares incluindo endocitose, secreção e sinalização celular. A proteína RECK está associada à membrana através de uma âncora GPI. Proteínas ligadas a GPI, dada sua propensão à associação com microdomínios lipídicos hidrofóbicos, localizam-se, preferencialmente, em balsas lipídicas ricas em colesterol (Brown & London, 1998). Desta forma, sugere-se que RECK exerça um papel nos processos celulares mediados pelas balsas lipídicas. Por exemplo, considerando-se a dinâmica existente entre a MEC, os receptores da MEC, o remodelamento da MEC e a arquitetura tecidual, RECK, atuando como regulador de MMP pode exercer uma importante função na arquitetura e na secreção da MEC, exercendo influência sobre diversos processos celulares (Weaver, 2002).

De maneira semelhante aos componentes convencionais das balsas lipídicas, RECK pode estar sujeito à regulação espacial resultado da clusterização de componentes das balsas lipídicas que ocorre após a ativação de receptores ou induzida pela partição dos motifs lipídicos para a membrana apical em associação com a aquisição de polaridade. Assim, RECK poderia estar envolvido na perda de polaridade que ocorre durante a progressão tumoral. Além disso, caso RECK transite dinamicamente entre a membrana basal e apical pode sugerir que a reorganização

espacial pode ser relevante na ativação da MMP e no turnover da MEC (Weaver, 2002).

Em algumas das diferentes condições analisadas o plaqueamento das células sobre elementos de matriz extracelular resultou em alteração significativa dos níveis relativos de expressão gênica de RECK, quando comparados com os níveis detectados em células mantidas sobre plástico, sugerindo papel dos elementos de matriz extracelular presentes no MATRIGEL™ no controle transcricional da expressão de RECK. Da mesma forma observada para os TIMPs, a indução da expressão gênica de RECK pode ser resultado da intensa proteólise do MATRIGEL™, dado que tal fato pode ser observado apenas para as linhagens celulares de alto potencial invasivo e metastático que apresentam elevada atividade proteolítica.

Considerando os resultados obtidos, pudemos observar uma regulação positiva da expressão gênica de proteinases e seus inibidores em linhagens celulares de alta capacidade invasiva e metastática sugerindo que, neste modelo de progressão tumoral de carcinoma mamário, a proteólise *in vitro* está sendo regulada pelo balanço entre a produção e ativação das proteinases e a produção de seus inibidores.

Modelo celular vs amostras teciduais

Dada a limitação de amostras teciduais, linhagens celulares têm sido utilizadas como ferramentas para o conhecimento da bioquímica e da biologia celular e molecular. Apesar do conhecimento de que a propagação de linhagens celulares *in vitro* pode alterar algumas vias de sinalização celular, linhagens celulares e amostras tumorais apresentam diversos padrões de expressão gênica em comum (Ross et al., 2000). No entanto, o enriquecimento de células malignas e a ausência de estroma em linhagens celulares podem comprometer as comparações entre linhagens e tumores (Birgersdotter et al., 2005). A fim de analisarmos a expressão gênica no contexto tumoral, descartando possíveis artefatos de cultura celular, o perfil de expressão das

MMPs e de seus inibidores foi analisado em amostras teciduais de tumores primários de mama e de mama normal adjacente.

Níveis de expressão gênica das MMPs e a progressão tumoral em amostras de pacientes

Tecidos de mama normal adjacente ao tumor apresentaram expressão gênica de todas as MMPs analisadas, inferindo-se que as MMPs estão envolvidas no remodelamento tecidual da mama. Corroborando os resultados obtidos, outros estudos detectaram os transcritos de MMP-2 e MMP-9 e as proteínas correspondentes em células epiteliais benignas (Garbett et al., 2000; Lebeau et al., 1999; Soini et al., 1994).

As MMPs -2, -9 e -14 exercem um papel crucial no desenvolvimento de metástase à distância em diversos tipos de câncer. No câncer de mama, níveis elevados de expressão destas MMPs no tecido tumoral estão associados com prognóstico desfavorável. Níveis elevados de expressão gênica das MMPs analisadas foram detectados nos tumores primários de mama quando comparados com os níveis detectados nos tecidos de borda normal adjacente.

Os níveis de expressão das MMPs nas amostras tumorais não apresentaram associação significativa com as características clínico-patológicas avaliadas, corroborando outros estudos em câncer de mama (Jones et al., 1999; Remacle et al., 1998; Tetu et al., 1998; Visscher et al., 1994), sugerindo que as MMPs podem fornecer informação prognóstica independente. No entanto, existem resultados conflitantes a respeito do valor prognóstico da expressão destas MMPs no câncer de mama humano o que parece se dever, em parte, devido às metodologias utilizadas (Lebeau et al., 2004). Em contraste com os resultados obtidos, (Talvensaari et al., 1999) observaram um aumento da taxa de recorrência associado com a positividade para MMP-2. (Scorilas et al., 2001) observaram uma associação inesperada entre a

positividade da MMP-9 e o curso clínico favorável. Além disso, o valor prognóstico das MMPs pode ser afetado por tratamentos sistêmicos adjuvantes (Li et al., 2004), fato que pode, em parte, explicar os resultados heterogêneos sobre o valor prognóstico das MMPs em diferentes estudos.

Níveis de expressão gênica dos TIMPs e a progressão tumoral em amostras de pacientes

Dado que os TIMPs são inibidores das MMPs *in vivo*, espera-se que níveis elevados destes inibidores possam prevenir a progressão tumoral e que, desta forma, estejam associados com bom prognóstico para pacientes com câncer. Além disso, têm sido demonstrado que a administração da proteína TIMP endógena ou a super expressão do gene como resultado de transfecção suprime o crescimento, a invasão e a metástase tumoral em diversos modelos (Chambers & Matrisian, 1997; DeClerck et al., 1992; Gomez et al., 1997; Imren et al., 1996).

A partir da análise dos resultados obtidos, pudemos observar que, de modo geral, tecidos tumorais de mama apresentam baixos níveis de expressão quando comparados com os níveis detectados em tecido de mama normal adjacente ao tumor. No entanto, análises de correlação demonstraram que os níveis mais elevados de TIMP foram detectados nas amostras tumorais que apresentaram maior expressão de MMPs, fator associado a pior prognóstico. Assim, a partir dos resultados de expressão gênica em tecidos e linhagens, bem como as análises de correlação, podemos sugerir que os níveis de expressão gênica dos TIMPs aumentam durante a progressão do tumor.

Altos níveis de expressão dos TIMPs estão associados com pior prognóstico de pacientes com câncer de mama mas podem não ser a causa disto dada a possibilidade da ocorrência de uma resposta celular à intensa proteólise tecidual como discutido anteriormente. Além disso, o envolvimento dos TIMPs na determinação da

progressão tumoral pode ser resultado de atividades promotoras de crescimento e de metástase.

TIMP-1 pode promover ou suprimir o crescimento do tumor, dependendo do contexto da célula tumoral individual e do potencial para o estabelecimento de "cross-talk" com outras vias de sinalização. Tal fato pode explicar porque os TIMPs estão geralmente super-expressos e não reprimidos em cânceres humanos e porque sua super-expressão é comumente associada com mau prognóstico (Sternlicht & Bergers, 2000). Para TIMP-2, dados conflitantes provenientes de amostras clínicas podem também ser reflexo do fato de que este inibidor participa tanto da ativação quanto da inibição da MMP-2. Em câncer de mama, níveis elevados de TIMP-2 em amostras de tecidos tumorais estão mais comumente relacionados com progressão desfavorável da doença (Visscher et al., 1994).

O balanço ou grau das diferentes funções do TIMP, como agente supressor ou indutor da progressão tumoral, depende do tipo de tumor e de sua concentração no espaço pericelular ou na matriz extracelular. O efeito mitogênico dos TIMPs e o efeito de TIMP-2 na atividade da MMP-2 parecem ser eventos dose-dependente. Concentrações elevadas de TIMP-2 provocam inibição da atividade da enzima, a qual é ativada em condições de baixa concentração do inibidor (Nagase, 1998). Desta forma, a análise dos níveis de expressão endógenos dos TIMPs podem fornecer um maior número de evidências quando comparados com estudos onde os níveis dos TIMPs são artificialmente alterados em modelos celulares, atingindo concentrações superiores à fisiológica.

Os níveis de expressão dos TIMPs nas amostras tumorais não apresentaram associação significativa com as características clínico-patológicas avaliadas, corroborando outros estudos em câncer de mama (Jones et al., 1999; Remacle et al., 1998; Tetu et al., 1998; Visscher et al., 1994), e sugerindo que os TIMPs podem fornecer informação prognóstica independente.

Níveis de expressão gênica de RECK e a progressão tumoral em amostras de pacientes

As amostras de tumores primários de mama apresentaram uma tendência de expressão gênica reduzida de RECK quando comparadas com os níveis de expressão detectados nas amostras de borda normal adjacente. Os níveis de expressão de RECK nas amostras tumorais não apresentaram associação significativa com as características clínico-patológicas avaliadas. No entanto, como discutido anteriormente para os TIMPs, considerando-se os resultados de expressão gênica em tecidos e linhagens, bem como as análises de correlação, podemos sugerir que os níveis de expressão gênica de RECK aumentam durante a progressão do tumor, correlacionando com aumento dos níveis de expressão das MMPs, sendo que os tumores que apresentam maior expressão de RECK devem corresponder aos mais agressivos. O aumento nos níveis de RECK não é suficiente para restabelecer o balanço MMP/inibidor, o qual segundo os resultados obtidos, favorece a enzima nas amostras tumorais. Assim, altos níveis de expressão de RECK estariam relacionados com intenso remodelamento da MEC e proteólise tecidual.

Além disso, devemos considerar a possibilidade de outros papéis para a proteína RECK que, como discutido anteriormente, é capaz de influenciar processos celulares distintos. Neste caso, considerando que RECK é uma proteína multifuncional, não podemos concluir se estaria atuando de forma a promover, mais do que suprimir, a progressão tumoral, o que justificaria a associação de altos níveis de expressão com tumores mais agressivos.

Considerando os resultados obtidos neste estudo podemos sugerir, de modo geral, que RECK é menos expresso em tecido tumoral quando comparado com tecido normal de borda adjacente. No entanto, tumores de estágio clínico mais avançado apresentam níveis elevados de expressão de RECK, os quais podem atingir níveis

superiores aos detectados em tecidos normais. Tal aumento pode ser explicado como uma resposta à presença de alta expressão e atividade de MMPs e intenso remodelamento de MEC. Assim, altos níveis de expressão de RECK estariam relacionados com tumores mais agressivos e estádios clínicos mais tardios. No entanto, dentre esses tumores, aqueles que atingem níveis suficientes para o estabelecimento do equilíbrio enzima/inibidor mais próximo do fisiológico seriam provenientes de pacientes de melhor prognóstico.

Assim, o aumento dos níveis de RECK em tumores de diferentes estádios clínicos estaria associada com estádios clínicos tardios e pior prognóstico. No entanto, estes tumores de pior prognóstico, que já apresentam níveis elevados de expressão de RECK, podem apresentar melhor curso clínico dependendo de como o balanço enzima/inibidor é alterado pelos níveis elevados do inibidor. Portanto, altos níveis de expressão de RECK podem estar correlacionados com melhor ou pior prognóstico para pacientes em estádios clínicos tardios, dependendo do contexto enzima/inibidor.

Altos níveis de expressão de RECK foram associados com prognóstico favorável em diversos tipos de tumores. Em amostras de hepatocarcinoma, a maior expressão de RECK no tumor em relação ao tecido normal adjacente foi associada com tumores menos invasivos e melhor prognóstico (Furumoto et al., 2001). O aumento dos níveis de RECK, atingindo níveis superiores a concentração no tecido normal, deve estar associado à elevada expressão e atividade das MMPs no tecido tumoral e deve ser suficiente para conter a invasão tumoral, inibindo significativamente a atividade proteolítica. Por outro lado, os tumores que apresentam níveis elevados de RECK mas que não atingem os níveis necessários para inibição significativa das MMPs estariam associados a pior prognóstico.

Altos níveis de expressão do gene *RECK* foram associados com melhor prognóstico em tumores de mama (Span et al., 2003). Neste estudo, a expressão de RECK foi avaliada em 10 amostras de tecido tumoral e tecido normal adjacente

demonstrando, como nos resultados obtidos no presente estudo, que tecidos tumorais de mama expressam menores níveis de RECK quando comparados com tecido normal. Para associação dos níveis de expressão de RECK com os dados clínico-patológicos foram avaliadas 278 amostras tumorais de câncer de mama. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, os níveis de expressão de RECK não apresentaram associação significativa com as características clínico-patológicas avaliadas. Nestas amostras, o nível médio de expressão gênica de RECK foi significativamente superior, e não inferior, em relação ao observado para as amostras normais, sugerindo que os dois grupos de amostras avaliadas são diferentes. As 278 amostras de pacientes analisadas representam um grupo de amostras que expressam níveis elevados de RECK, justificando a associação da elevada expressão de RECK com melhor prognóstico.

A caracterização do *status* de RECK como fator prognóstico em tumor de células não pequenas de pulmão corrobora os resultados obtidos no presente estudo demonstrando que níveis elevados de RECK estão associados com melhor prognóstico apenas para pacientes em estádios clínicos tardios (Takenaka et al., 2004; Takenaka et al., 2005).

Em amostras de câncer colorretal também pode ser observada uma menor expressão de RECK no tecido tumoral (Takeuchi et al., 2004). Além disso, pacientes de melhor prognóstico apresentaram níveis de expressão gênica de RECK elevados em relação aos níveis de expressão de MMP-9, fortalecendo a hipótese de que a expressão elevada de RECK pode ser indicativa de melhor prognóstico dependendo do balanço MMP/inibidor.

Dado seu papel como inibidor da invasão, metástase e angiogênese tumoral, RECK pode ser um alvo promissor para a prevenção e o tratamento do câncer. A atividade inibitória da forma solúvel de RECK suporta tal hipótese dado que o *delivery*

da proteína não será problema caso a estabilidade possa ser atingida sem toxicidade. No entanto, testes clínicos utilizando inibidores de MMPs têm demonstrado que o conhecimento dos eventos regulados pelas MMPs e seus inibidores durante o desenvolvimento do tumor é ainda incompleto (Rhee & Coussens, 2002).

Correlação dos níveis de expressão gênica das MMPs e de seus inibidores em modelo celular e em amostras teciduais

Análises estatísticas demonstraram a existência de uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre os níveis de expressão gênica relativa de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores em linhagens celulares e em amostras de carcinoma de mama humano, sugerindo a existência de vias biológicas comuns regulando a sinalização pró-metastática

Associações similares entre proteases e seus inibidores foram descritas em câncer de mama (McCarthy et al., 1999). A correlação entre os níveis de expressão gênica de proteases e seus respectivos inibidores pode ser explicada pela regulação coordenada destes dois grupos de moléculas. Os fatores de transcrição Ets, por exemplo, possuem a habilidade de ativar a transcrição das MMPs e dos TIMPs. Amostras de câncer de mama apresentam co-expressão dos fatores de transcrição Ets e de MMPs (Bieche et al., 2004). Estudos recentes detectaram uma associação significativa entre os níveis de expressão gênica dos fatores de transcrição Ets, MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 (Davidson et al., 2004).

A existência de co-regulação da expressão basal da MMP-2, MMP-14 (MT1-MMP) e TIMP-2 foi previamente observada e parece ser resultado de similaridade das regiões promotoras destes genes (Lohi et al., 2000). A regulação coordenada da expressão destes genes é consistente com a ocorrência de cooperação entre estas proteínas durante o processo de ativação da MMP-2. A correlação positiva

estatisticamente significativa observada entre os níveis de expressão de RECK e os níveis de expressão destes genes em linhagens celulares e em amostras tumorais de mama sugere que a transcrição de RECK sofre regulação dos mesmos fatores e que a proteína RECK, na superfície da célula, pode exercer uma função relacionada com o complexo ternário de ativação da MMP-2.

Além disso, a síntese do inibidor pode ser uma resposta celular à presença da protease, o que corrobora os resultados obtidos dado que altos níveis de expressão gênica de inibidores foram detectados em linhagens celulares de fenótipo agressivo que apresentam altos níveis de expressão e atividade de MMPs.

A existência de associação entre os níveis de expressão de TIMP-1, TIMP-2 e RECK sugere que fatores comuns estão envolvidos na regulação da expressão destes inibidores no câncer de mama. Além disso, estudos recentes demonstraram que TIMP-2 induz a expressão de *RECK* em células endoteliais (Oh et al., 2004), o que corrobora os perfis de expressão semelhantes obtidos para estes genes em linhagens celulares e em amostras teciduais de câncer de mama, podendo explicar a existência de uma correlação positiva significativa entre os níveis de expressão destes genes.

Balanco transcricional MMP/inibidor em amostras teciduais

Os resultados obtidos sugerem que o balanço entre a produção e a ativação de proteinases e a produção de seus inibidores é o mais importante determinante da proteólise *in vivo*. Alterações na relação MMP/inibidor afetam o balanço entre síntese e degradação da matriz e podem contribuir para o potencial invasivo de tumores sólidos. A fim de verificarmos a possível ocorrência de alterações no balanço dos níveis relativos de expressão gênica enzima/inibidor entre as amostras de borda normal adjacente e as amostras de tumores primários de mama, determinamos a razão entre os níveis de expressão das metaloproteinases analisadas em relação aos níveis de expressão dos inibidores específicos. Pudemos observar que, em todos os

casos, o balanço favorece a enzima nas amostras tumorais e, de modo contrário, o inibidor específico nas amostras de borda normal. Tais observações sugerem que, em tecidos normais, o potencial degradativo das MMPs pode ser adequadamente controlado e equilibrado pela presença do inibidor específico. Por outro lado, a expressão elevada das MMPs em tumores resulta em perda da regulação exercida pelos inibidores, favorecendo a progressão tumoral. O balanço da expressão da MMP-2 e da MMP-9 em relação à expressão de TIMP-1 e TIMP-2 mostrou-se ser um fator essencial na agressividade do câncer cervical (Nuovo et al., 1995). Em câncer de mama foi observado que o balanço MMP-2/TIMP-2 favorece mais a enzima em pacientes que apresentam comprometimento de linfonodos quando comparado com os valores observados para pacientes que não apresentam comprometimento linfonodal (Onisto et al., 1995). O balanço entre os níveis de expressão de RECK e os níveis de expressão da MMP-2, da MMP-9 e da MMP-14 (MT1-MMP) favorece a enzima nas amostras de tumores primário de mama, quando comparados com o observado para as amostras de tecido normal adjacente ao tumor.

A utilização do balanço enzima/inibidor como fator prognóstico na determinação do risco do desenvolvimento de metástases à distância poderá ser verificado através de estudos envolvendo um maior tempo de seguimento das pacientes (Blavier et al., 1999).

Níveis de expressão protéica de RECK e a progressão tumoral em amostras de pacientes

A fim de avaliarmos mais detalhadamente o envolvimento de RECK na progressão do câncer de mama humano foram realizados ensaios de Tissue Microarray. Além de permitir a análise de um número significativo de amostras, a técnica utilizada avalia o perfil de expressão protéica, a qual não necessariamente correlaciona com nível de transcritos detectados em ensaios de *Real-Time PCR*.

Os níveis de expressão protéica de RECK apresentaram associação estatisticamente significativa em relação ao estágio clínico dos tumores. Níveis elevados da proteína RECK foram detectados em tumores de estágios clínicos tardios. Além disso, níveis elevados de expressão de RECK apresentaram associação com menor taxa de sobrevida global.

A ausência de correlação entre os níveis de expressão gênica de RECK e o estadiamento clínico das amostras pode estar associada ao número amostral reduzido e à pequena representatividade dos estágios tardios. Além disso, o reduzido número de amostras utilizadas nas análises de expressão gênica, bem como menor tempo de seguimento das pacientes, são fatores limitantes para a avaliação das taxas de sobrevida global e sobrevida livre de recorrência.

Os resultados obtidos pela análise da expressão protéica de RECK em larga escala corroboram os resultados obtidos para o perfil de expressão gênica de RECK em linhagens celulares e em amostras teciduais de carcinoma de mama e fortalecem a hipótese de que altos níveis de RECK podem estar associados a tumores mais agressivos e pior prognóstico para pacientes com câncer de mama.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pacientes diagnosticados com câncer de mama primário são submetidos ao tratamento sistêmico, em adição a terapia loco-regional do tumor, segundo avaliação de variáveis prognósticas como *status* nodal, tamanho do tumor, grau de malignidade, idade e *status* do receptor hormonal (Wurtz et al., 2005). Utilizando estas variáveis prognósticas, a terapia sistêmica adjuvante é oferecida para a maioria das pacientes linfonodo negativas (~60%) e para todas as pacientes linfonodo positivas, ou seja, para um grupo prognosticamente heterogêneo com riscos variando de 10 a 80%. A terapia sistêmica adjuvante previne 30-40% das mortes esperadas (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998a, 1998b); no entanto, em termos absolutos, a redução da mortalidade varia de uma pequena porcentagem no grupo de baixo risco e mais de 25% no grupo de alto risco. Desta forma, apesar da terapia sistêmica adjuvante resultar num aumento significativo da sobrevida da população com câncer de mama, uma grande proporção de pacientes está sendo submetida a um tratamento excessivo. Dado que o tratamento causa muitos efeitos adversos e implica em custos consideráveis para a sociedade, fatores prognósticos adicionais devem ser identificados com a finalidade de melhorar a classificação dos pacientes com câncer de mama.

Muitos marcadores de prognóstico, que poderão ser úteis no câncer de mama, estão sobre investigação. Uma característica comum destes novos marcadores são seu papel nas principais alterações fenotípicas que caracterizam o câncer de mama como alta taxa de proliferação, evasão da apoptose, angiogênese, invasão e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000).

O presente estudo teve como objetivo analisar o perfil de expressão de MMPs e seus inibidores, moléculas envolvidas no processo de invasão e metástase tumoral, em modelo celular de linhagens tumorais e em tumores primários de mama.

Uma das vantagens do modelo selecionado é a representatividade de um espectro de fenótipos que representam a ocorrência da EMT, evento essencial na progressão tumoral. Além disso, o estudo concomitante de uma variedade de MMPs e de seus inibidores em um painel de cinco linhagens celulares proporcionou um melhor entendimento das interações que são estabelecidas entre estes dois grupos de moléculas. Tal fato tem grande importância considerando-se que os resultados obtidos indicam que o fator determinante da invasão e metástase tumoral é o balanço MMP/inibidor. Ainda assim, outros membros destas famílias devem ser considerados para análise do perfil geral da proteólise *in vivo*. Estes incluem outras MMPs e inibidores como TIMP-3 e TIMP-4.

A caracterização do perfil de expressão protéica de RECK em um número significativo de amostras, além de corroborar com os resultados obtidos para os níveis de expressão do transcrito de RECK, permitiu uma melhor análise da associação da expressão de RECK com características clínico-patológicas. A determinação do perfil de expressão protéica das MMPs e dos TIMPs nas mesmas amostras avaliadas para RECK permitirá verificarmos o balanço protéico MMP/inibidor.

O aumento do número de amostras poderá auxiliar na determinação da significância clínica da identificação dos níveis de expressão das MMPs e dos TIMPs. Além disso, utilizando-se um valor adequado de *cut-off*, diferente da média dos valores de expressão, associações significativas entre os níveis de expressão das MMPs e de seus inidores e características clínico-patológicas poderão ser reveladas.

É interessante notar que resultados semelhantes e complementares foram obtidos a partir do estudo do perfil de expressão em linhagens celulares estabelecidas e amostras teciduais. Tal fato sugere que o modelo celular pode ser útil na análise do papel funcional destes genes dado que as vias de sinalização envolvidas nos mecanismos regulatórios da expressão dos genes analisados estão preservadas no modelo celular.

De modo geral, na progressão tumoral do câncer de mama o aumento dos níveis de expressão e atividade de MMPs correlacionam positivamente com o aumento dos níveis de expressão de seus inibidores (TIMPs e RECK) sendo que o balanço enzima/inibidor é o mais importante fator determinante da proteólise tecidual.

Os resultados obtidos contribuíram para um melhor entendimento da complexidade da biologia da metástase do câncer de mama e sugerem que as moléculas analisadas poderão ser úteis como marcadores de prognóstico em câncer de mama.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, O.A., Carmichael, D.F. & DeClerck, Y.A. (1990). Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst*, **82**, 589-95.
- American Cancer Society (2006). *Cancer Facts and Figures 2006*. Atlanta: American Cancer Society.
- ATCC www.atcc.org
- Aumailley, M. & Gayraud, B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med*, **76**, 253-65.
- Ausubel, F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. Inc : Boston.
- Azzam, H.S., Arand, G., Lippman, M.E. & Thompson, E.W. (1993). Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 1758-64.
- Bachmeier, B.E., Albini, A., Vene, R., Benelli, R., Noonan, D., Weigert, C., Weiler, C., Lichtinghagen, R., Jochum, M. & 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.
- Bachmeier, B.E., Nerlich, A.G., Lichtinghagen, R. & Sommerhoff, C.P. (2001). Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res*, **21**, 3821-8.
- BD Technical Bulletin www.bdbiosciences.com
- Bae, S.N., Arand, G., Azzam, H., Pavasant, P., Torri, J., Frandsen, T.L. & Thompson, E.W. (1993). Molecular and cellular analysis of basement membrane invasion by human breast cancer cells in Matrigel-based in vitro assays. *Breast Cancer Res Treat*, **24**, 241-55.
- Baker, E.A., Stephenson, T.J., Reed, M.W. & Brown, N.J. (2002). Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol*, **55**, 300-4.
- Balduyck, M., Zerimech, F., Gouyer, V., Lemaire, R., Hemon, B., Grard, G., Thiebaut, C., Lemaire, V., Dacquembron, E., Duhem, T., Lebrun, A., Dejonghe, M.J. & Huet, G. (2000). Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis*, **18**, 171-8.
- Bartsch, J.E., Staren, E.D. & Appert, H.E. (2003). Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res*, **110**, 383-92.
- Benaud, C., Dickson, R.B. & Thompson, E.W. (1998). Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **50**, 97-116.
- Bieche, I., Tozlu, S., Girault, I., Onody, P., Driouch, K., Vidaud, M. & Lidereau, R. (2004). Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis*, **25**, 405-11.
- Bigg, H.F., Shi, Y.E., Liu, Y.E., Steffensen, B. & Overall, C.M. (1997). Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem*, **272**, 15496-500.
- Birgersdotter, A., Sandberg, R. & Ernberg, I. (2005). Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*, **15**, 405-12.
- Bissell, M.J. & Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, **1**, 46-54.
- Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver, V.M. & Petersen, O.W. (2002). The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, **70**, 537-46.
- Blavier, L., Henriot, P., Imren, S. & Declerck, Y.A. (1999). Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann N Y Acad Sci*, **878**, 108-19.
- Bode, W. & Maskos, K. (2003). Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem*, **384**, 863-72.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H. & Marky, L.A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3746-50.
- Brew, K., Dinakarandian, D. & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 267-83.
- Brochado S.M., Figueira R.C.S., Sasahara R.M. & Sogayar M.C. Inhibition of cell cycle progression by RECK is mediated by upregulation of p21^{Cip1}.
- Brown, D.A. & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 111-36.

- Butler, G.S., Hutton, M., Wattam, B.A., Williamson, R.A., Knauper, V., Willenbrock, F. & Murphy, G. (1999). The specificity of TIMP-2 for matrix metalloproteinases can be modified by single amino acid mutations. *J Biol Chem*, **274**, 20391-6.
- Cailleau, R., Olive, M. & Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, **14**, 911-5.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-57.
- Caterina, N.C., Windsor, L.J., Yermovsky, A.E., Bodden, M.K., Taylor, K.B., Birkedal-Hansen, H. & Engler, J.A. (1997). Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Biol Chem*, **272**, 32141-9.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, **2**, 563-72.
- Chambers, A.F. & Matrisian, L.M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1260-70.
- Chang, C. & Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, **11**, S37-43.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-9.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S. & Hynes, R.O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, **406**, 532-5.
- Clavel, C., Polette, M., Doco, M., Binniger, I. & Birembaut, P. (1992). Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer*, **79**, 261-70.
- Davidson, B., Konstantinovskiy, S., Nielsen, S., Dong, H.P., Berner, A., Vyberg, M. & Reich, R. (2004). Altered expression of metastasis-associated and regulatory molecules in effusions from breast cancer patients: a novel model for tumor progression. *Clin Cancer Res*, **10**, 7335-46.
- DeClerck, Y.A., Perez, N., Shimada, H., Boone, T.C., Langley, K.E. & Taylor, S.M. (1992). Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res*, **52**, 701-8.
- Duffy, M.J., Maguire, T.M., Hill, A., McDermott, E. & O'Higgins, N. (2000). Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*, **2**, 252-7.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials.
- Egeblad, M. & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-74.
- Eisenberg, I., Hochner, H., Sadeh, M., Argov, Z. & Mitrani-Rosenbaum, S. (2002). Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. *Cytogenet Genome Res*, **97**, 58-61.
- Engel, L.W., Young, N.A., Tralka, T.S., Lippman, M.E., O'Brien, S.J. & Joyce, M.J. (1978). Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res*, **38**, 3352-64.
- Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.
Ministério da Saúde www.saude.gov.br
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*, **137**, 266-7.
- Foda, H.D. & Zucker, S. (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today*, **6**, 478-482.
- Foekens, J.A., Schmitt, M., van Putten, W.L., Peters, H.A., Kramer, M.D., Janicke, F. & Klijn, J.G. (1994). Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol*, **12**, 1648-58.
- Fujimoto, N., Mouri, N., Iwata, K., Ohuchi, E., Okada, Y. & Hayakawa, T. (1993). A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 2 (72-kDa gelatinase/type IV collagenase) using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta*, **221**, 91-103.
- Furumoto, K., Arai, S., Mori, A., Furuyama, H., Gorin Rivas, M.J., Nakao, T., Isobe, N., Murata, T., Takahashi, C., Noda, M. & 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*, **33**, 189-95.

- Garbett, E.A., Reed, M.W. & Brown, N.J. (1999). Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer*, **81**, 287-93.
- Garbett, E.A., Reed, M.W., Stephenson, T.J. & Brown, N.J. (2000). Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol*, **53**, 99-106.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. & Thorgeirsson, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, **74**, 111-22.
- Gordon, L.A., Mulligan, K.T., Maxwell-Jones, H., Adams, M., Walker, R.A. & Jones, J.L. (2003). Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype. *Int J Cancer*, **106**, 8-16.
- Greene, J., Wang, M., Liu, Y.E., Raymond, L.A., Rosen, C. & Shi, Y.E. (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem*, **271**, 30375-80.
- Gross, J. & Lapiere, C.M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **48**, 1014-22.
- Hackett, A.J., Smith, H.S., Springer, E.L., Owens, R.B., Nelson-Rees, W.A., Riggs, J.L. & 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**, 1795-806.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Haupt, L.M., Thompson, E.W., Trezise, A.E., Irving, R.E., Irving, M.G. & Griffiths, L.R. (2006). In vitro and in vivo MMP gene expression localisation by In Situ-RT-PCR in cell culture and paraffin embedded human breast cancer cell line xenografts. *BMC Cancer*, **6**, 18.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E. & Shinagawa, A. (1994). Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*, **107** (Pt 9), 2373-9.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. & Iwata, K. (1992). Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett*, **298**, 29-32.
- Henriet, P., Blavier, L. & Declerck, Y.A. (1999). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *Apmis*, **107**, 111-9.
- Herman, M.P., Sukhova, G.K., Kiesel, W., Foster, D., Kehry, M.R., Libby, P. & Schonbeck, U. (2001). Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest*, **107**, 1117-26.
- Heussen, C. & Dowdle, E.B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem*, **102**, 196-202.
- Howard, E.W. & Banda, M.J. (1991). Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *J Biol Chem*, **266**, 17972-7.
- Hynes, R.O. (1994). Genetic analyses of cell-matrix interactions in development. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 569-74.
- Imren, S., Kohn, D.B., Shimada, H., Blavier, L. & DeClerck, Y.A. (1996). Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 retroviral-mediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion. *Cancer Res*, **56**, 2891-5.
- Ip, M.M. & Darcy, K.M. (1996). Three-dimensional mammary primary culture model systems. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **1**, 91-110.
- Itoh, Y. & Nagase, H. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem*, **38**, 21-36.
- Iwata, H., Kobayashi, S., Iwase, H., Masaoka, A., Fujimoto, N. & Okada, Y. (1996). Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, **87**, 602-11.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, **4**, 549-53.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. & Thun, M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, **56**, 106-30.
- John, A. & Tuszynski, G. (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*, **7**, 14-23.
- Jones, J.L., Glynn, P. & Walker, R.A. (1999). Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol*, **189**, 161-8.
- Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K. & Quaranta, V. (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol*, **148**, 615-24.
- Kousidou, O.C., Roussidis, A.E., Theocharis, A.D. & Karamanos, N.K. (2004). Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res*, **24**, 4025-30.

- Kramer, R.H., Bensch, K.G. & Wong, J. (1986). Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. *Cancer Res*, **46**, 1980-9.
- Kuvaja, P., Talvensaaari-Mattila, A., Paakko, P. & Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005). The absence of immunoreactivity for tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), but not for TIMP-2, protein is associated with a favorable prognosis in aggressive breast carcinoma. *Oncology*, **68**, 196-203.
- Laborda, J. (1991). 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acids Res*, **19**, 3998.
- Lacroix, M. & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*, **83**, 249-89.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. & Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, **49**, 187-98.
- Lebeau, A., Muller-Aufdemkamp, C., Allmacher, C., Sauer, U., Nerlich, A., Lichtinghagen, R. & Lohrs, U. (2004). Cellular protein and mRNA expression patterns of matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human breast cancer: correlation with tumour growth. *J Mol Histol*, **35**, 443-55.
- Lebeau, A., Nerlich, A.G., Sauer, U., Lichtinghagen, R. & Lohrs, U. (1999). Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast carcinomas. *Anticancer Res*, **19**, 4257-64.
- Lee, J.H. & Welch, D.R. (1997). Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res*, **57**, 2384-7.
- Lee, Y.T. (1983). Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. *J Surg Oncol*, **23**, 175-80.
- Li, H.C., Cao, D.C., Liu, Y., Hou, Y.F., Wu, J., Lu, J.S., Di, G.H., Liu, G., Li, F.M., Ou, Z.L., Jie, C., Shen, Z.Z. & Shao, Z.M. (2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, **88**, 75-85.
- Li, L., Price, J.E., Fan, D., Zhang, R.D., Bucana, C.D. & Fidler, I.J. (1989). Correlation of growth capacity of human tumor cells in hard agarose with their in vivo proliferative capacity at specific metastatic sites. *J Natl Cancer Inst*, **81**, 1406-12.
- Lindsay, C.K., Thorgeirsson, U.P., Tsuda, H. & Hirohashi, S. (1997). Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagenase/gelatinase messenger RNAs in human breast cancer. *Hum Pathol*, **28**, 359-66.
- Liotta, L.A., Steeg, P.S. & Stetler-Stevenson, W.G. (1991a). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, **64**, 327-36.
- Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G. & Steeg, P.S. (1991b). Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest*, **9**, 543-51.
- Lochter, A., Sternlicht, M.D., Werb, Z. & Bissell, M.J. (1998). The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*, **857**, 180-93.
- Lohi, J., Lehti, K., Valtanen, H., Parks, W.C. & Keski-Oja, J. (2000). Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene*, **242**, 75-86.
- Lukashev, M.E. & Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*, **8**, 437-41.
- Luparello, C., Avanzato, G., Carella, C. & Pucci-Minafra, I. (1999). Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **54**, 235-44.
- Masui, T., Doi, R., Koshiba, T., Fujimoto, K., Tsuji, S., Nakajima, S., Koizumi, M., Toyoda, E., Tulachan, S., Ito, D., Kami, K., Mori, T., Wada, M., Noda, M. & Imamura, M. (2003). RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin Cancer Res*, **9**, 1779-84.
- McCarthy, K., Maguire, T., McGreal, G., McDermott, E., O'Higgins, N. & Duffy, M.J. (1999). High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Cancer*, **84**, 44-8.
- Miyazaki, K., Hasegawa, M., Funahashi, K. & Umeda, M. (1993). A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature*, **362**, 839-41.
- Moinfar, F., Man, Y.G., Arnould, L., Bratthauer, G.L., Ratschek, M. & Tavassoli, F.A. (2000). Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res*, **60**, 2562-6.
- Mott, J.D., Thomas, C.L., Rosenbach, M.T., Takahara, K., Greenspan, D.S. & Banda, M.J. (2000). Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J Biol Chem*, **275**, 1384-90.
- Mueller, M.M. & Fusenig, N.E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, **4**, 839-49.

- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E. & Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, **410**, 50-6.
- Nagase, H. (1998). Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res*, **8**, 179-86.
- Nagase, H. & Brew, K. (2002). Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res*, **4 Suppl 3**, S51-61.
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, **69**, 562-73.
- Nagase, H. & Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, **274**, 21491-4.
- Nakopoulou, L., Giannopoulou, I., Stefanaki, K., Panayotopoulou, E., Tsirmpa, I., Alexandrou, P., Mavrommatis, J., Katsarou, S. & Davaris, P. (2002). Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol*, **197**, 307-13.
- Noda, M., Kitayama, H., Matsuzaki, T., Sugimoto, Y., Okayama, H., Bassin, R.H. & Ikawa, Y. (1989). Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 162-6.
- Nuovo, G.J., MacConnell, P.B., Simsir, A., Valea, F. & French, D.L. (1995). Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res*, **55**, 267-75.
- Oh, J., Seo, D.W., Diaz, T., Wei, B., Ward, Y., Ray, J.M., Morioka, Y., Shi, S., Kitayama, H., Takahashi, C., Noda, M. & Stetler-Stevenson, W.G. (2004). Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res*, **64**, 9062-9.
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itoharu, S., Takahashi, C. & Noda, M. (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, **107**, 789-800.
- Onisto, M., Riccio, M.P., Scannapieco, P., Caenazzo, C., Griggio, L., Spina, M., Stetler-Stevenson, W.G. & Garbisa, S. (1995). Gelatinase A/TIMP-2 imbalance in lymph-node-positive breast carcinomas, as measured by RT-PCR. *Int J Cancer*, **63**, 621-6.
- Pavelic, K. & Gail-Troselj, K. (2001). Recent advances in molecular genetics of breast cancer. *J Mol Med*, **79**, 566-73.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**, 747-52.
- Petersen, O.W., Lind Nielsen, H., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Ronnov-Jessen, L. & Bissell, M.J. (2001). The plasticity of human breast carcinoma cells is more than epithelial to mesenchymal conversion. *Breast Cancer Res*, **3**, 213-7.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Polette, M., Clavel, C., Cockett, M., Girod de Bentzmann, S., Murphy, G. & Birembaut, P. (1993). Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion Metastasis*, **13**, 31-7.
- Price, J.E., Polyzos, A., Zhang, R.D. & Daniels, L.M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*, **50**, 717-21.
- Pulyaeva, H., Bueno, J., Polette, M., Birembaut, P., Sato, H., Seiki, M. & Thompson, E.W. (1997). MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*, **15**, 111-20.
- Ramirez, F. & Rifkin, D.B. (2003). Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol*, **22**, 101-7.
- Ree, A.H., Florenes, V.A., Berg, J.P., Maelandsmo, G.M., Nesland, J.M. & Fodstad, O. (1997). High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res*, **3**, 1623-8.
- Remacle, A., McCarthy, K., Noel, A., Maguire, T., McDermott, E., O'Higgins, N., Foidart, J.M. & Duffy, M.J. (2000). High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*, **89**, 118-21.
- Remacle, A.G., Noel, A., Duggan, C., McDermott, E., O'Higgins, N., Foidart, J.M. & Duffy, M.J. (1998). Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer. *Br J Cancer*, **77**, 926-31.
- Rhee, J.S. & Coussens, L.M. (2002). RECKing MMP function: implications for cancer development. *Trends Cell Biol*, **12**, 209-11.

- Ritter, L.M., Garfield, S.H. & Thorgeirsson, U.P. (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 494-9.
- Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S.S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Botstein, D. & Brown, P.O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*, **24**, 227-35.
- Sambrook, J.S. & Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Sasahara, R.M., Brochado, S.M., Takahashi, C., Oh, J., Maria-Engler, S.S., Granjeiro, J.M., Noda, M. & Sogayar, M.C. (2002). Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer Detect Prev*, **26**, 435-43.
- Savagner, P. (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*, **23**, 912-23.
- Schrohl, A.S., Christensen, I.J., Pedersen, A.N., Jensen, V., Mouridsen, H., Murphy, G., Foekens, J.A., Brunner, N. & Holten-Andersen, M.N. (2003). Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer. *Mol Cell Proteomics*, **2**, 164-72.
- Schrohl, A.S., Holten-Andersen, M.N., Peters, H.A., Look, M.P., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G., Brunner, N. & Foekens, J.A. (2004). Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 2289-98.
- Scorilas, A., Karameris, A., Amogiannaki, N., Ardavanis, A., Bassilopoulos, P., Trangas, T. & Talieri, M. (2001). Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer*, **84**, 1488-96.
- Shofuda, K., Moriyama, K., Nishihashi, A., Higashi, S., Mizushima, H., Yasumitsu, H., Miki, K., Sato, H., Seiki, M. & Miyazaki, K. (1998). Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in regulation of pro-gelatinase A activation catalyzed by membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in human cancer cells. *J Biochem (Tokyo)*, **124**, 462-70.
- Soini, Y., Hurskainen, T., Hoyhtya, M., Oikarinen, A. & Autio-Harmainen, H. (1994). 72 KD and 92 KD type IV collagenase, type IV collagen, and laminin mRNAs in breast cancer: a study by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, **42**, 945-51.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-16.
- Span, P.N., Sweep, C.G., Manders, P., Beex, L.V., Leppert, D. & 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**, 2710-5.
- Steeg, P.S. (2005). Cancer biology: emissaries set up new sites. *Nature*, **438**, 750-1.
- Sternlicht, M. & Bergers, G. (2000). Matrix metalloproteinases as emerging targets in cancer: status and prospects. *ETT* **4**: 609-633.
- Sternlicht, M.D., Lochter, A., Simpson, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., Gray, J.W., Pinkel, D., Bissell, M.J. & Werb, Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, **98**, 137-46.
- Sternlicht, M.D. & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 463-516.
- Styblo, T.M. & Wood W.C. Traditional prognostic factors for breast cancer The breast: *Comprehensive management of benign and malignant diseases*.
- Takahashi, C., Sheng, Z., Horan, T.P., Kitayama, H., Maki, M., Hitomi, K., Kitaura, Y., Takai, S., Sasahara, R.M., Horimoto, A., Ikawa, Y., Ratzkin, B.J., Arakawa, T. & Noda, M. (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**, 13221-6.
- Takenaka, K., Ishikawa, S., Kawano, Y., Yanagihara, K., Miyahara, R., Otake, Y., Morioka, Y., Takahashi, C., Noda, M., Wada, H. & Tanaka, F. (2004). Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, **40**, 1617-23.
- Takenaka, K., Ishikawa, S., Yanagihara, K., Miyahara, R., Hasegawa, S., Otake, Y., Morioka, Y., Takahashi, C., Noda, M., Ito, H., Wada, H. & Tanaka, F. (2005). Prognostic significance of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs expression in resected pathologic stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*, **12**, 817-24.

- Takeuchi, T., Hisanaga, M., Nagao, M., Ikeda, N., Fujii, H., Koyama, F., Mukogawa, T., Matsumoto, H., Kondo, S., Takahashi, C., Noda, M. & Nakajima, Y. (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**, 5572-9.
- Talvensaari-Mattila, A., Paakko, P. & Turpeenniemi-Hujanen, T. (2003). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer*, **89**, 1270-5.
- Talvensaari, A., Apaja-Sarkkinen, M., Hoyhtya, M., Westerlund, A., Puistola, U. & Turpeenniemi, T. (1999). Matrix metalloproteinase 2 immunoreactive protein appears early in cervical epithelial dedifferentiation. *Gynecol Oncol*, **72**, 306-11.
- Terranova, V.P., Hujanen, E.S., Loeb, D.M., Martin, G.R., Thornburg, L. & Glushko, V. (1986). Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 465-9.
- Tetu, B., Brisson, J., Lapointe, H. & Bernard, P. (1998). Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A, and urokinase expression in breast cancer. *Hum Pathol*, **29**, 979-85.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 740-6.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 5201-5.
- Thompson, E.W., Paik, S., Brunner, N., Sommers, C.L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T.B., Torri, J., Donahue, S., Lippman, M.E. & et al. (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol*, **150**, 534-44.
- Tlsty, T.D. & Hein, P.W. (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 54-9.
- Ueno, H., Nakamura, H., Inoue, M., Imai, K., Noguchi, M., Sato, H., Seiki, M. & Okada, Y. (1997). Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res*, **57**, 2055-60.
- van der Jagt, M.F., Sweep, F.C., Waas, E.T., Hendriks, T., Ruers, T.J., Merry, A.H., Wobbes, T. & Span, P.N. (2005). Correlation of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer. *Cancer Lett*.
- Vihinen, P. & Kahari, V.M. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*, **99**, 157-66.
- Vincent-Salomon, A. & Thiery, J.P. (2003). Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res*, **5**, 101-6.
- Visscher, D.W., Hoyhtya, M., Ottosen, S.K., Liang, C.M., Sarkar, F.H., Crissman, J.D. & Fridman, R. (1994). Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer*, **59**, 339-44.
- Visse, R. & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, **92**, 827-39.
- Vu, T.H. (2001). Don't mess with the matrix. *Nat Genet*, **28**, 202-3.
- Ward, R.V., Hembry, R.M., Reynolds, J.J. & Murphy, G. (1991). The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochem J*, **278** (Pt 1), 179-87.
- Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E. & Giancotti, F.G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*, **87**, 733-43.
- Weaver, V.M. (2002). Membrane-associated MMP regulators: novel cell adhesion tumor suppressor proteins? *Dev Cell*, **2**, 6-7.
- Weigelt, B., Peterse, J.L. & van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, **5**, 591-602.
- Welch, D.R., Steeg, P.S. & Rinker-Schaeffer, C.W. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Res*, **2**, 408-16.
- Werb, Z., Ashkenas, J., MacAuley, A. & Wiesen, J.F. (1996). Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res*, **29**, 1087-97.
- Winnischofer, S.M.B., Figueira, R.C.S., Sasahara, R.M., Sogayar, M.C. (2005). RECK gene expression is regulated in cell cycle progression. *Submetido a Cellular Signalling*.
- Wojtowicz-Praga, S.M., Dickson, R.B. & Hawkins, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs*, **15**, 61-75.

- Woodward, T.L., Xie, J.W. & Haslam, S.Z. (1998). The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **3**, 117-31.
- Wurtz, S.O., Schrohl, A.S., Sorensen, N.M., Lademann, U., Christensen, I.J., Moundsen, H. & Brunner, N. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **12**, 215-27.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. & Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, **117**, 927-39.
- Yang, X., Welch, D.R., Phillips, K.K., Weissman, B.E. & Wei, L.L. (1997). KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Lett*, **119**, 149-55.
- Yoshiji, H., Gomez, D.E. & Thorgeirsson, U.P. (1996). Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human breast cancer. *Int J Cancer*, **69**, 131-4.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, **14**, 163-76.
- Yu, W.H., Yu, S., Meng, Q., Brew, K. & Woessner, J.F., Jr. (2000). TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, **275**, 31226-32.