UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Associação entre alta expressão e atividade de
metaloproteinases e presença de HPV em linhagens de
carcinomas cervicais humanos

Laura Beatriz da Silva Cardeal

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

São Paulo

2006

Laura Beatriz da Silva Cardeal

Associação entre alta expressão e atividade de
metaloproteinases e presença de HPV em linhagens de
carcinomas cervicais humanos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvyia Stuchi Maria-Engler
orientadora/presidente

Prof. Dr. Chin Jia Lin
1º. examinador

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
2º. examinador

São Paulo, 02 de Junho de 2006.

*Aos meus pais, pelo amor, dedicação e apoio incondicionais,
À minha irmã, pelas muitas horas de conversas,*

*Ao Arthur, por todo carinho e compreensão,
meus dias são mais felizes com você!*

AGRADECIMENTOS

Definitivamente, ir para bancada é muito mais fácil que escrever para todos que quero agradecer, mas vamos lá.....

À Deus por ter me permitido começar a me tornar uma “cientista”.

À minha querida orientadora, Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, por ter confiado a mim uma parte do seu projeto, e acreditado que eu o poderia fazer. Por toda orientação, não só profissional, mas também pessoal. Por ter participado, e ainda estar participando, da evolução do nosso laboratório. A sua paciência, atenção, dedicação e coração estão sempre presentes na minha vida.

À minha banca de qualificação, Dr. Enrique Boccardo, Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella, Dr. Fernando Salvador Moreno e Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer, e à minha banca de defesa Dra. Maria Luiza Silveira Mello, Dra. Ana Campa, Dr. Enrique Boccardo, Dr. Fernando Salvador Moreno e Dr. Chin Jia Lin, por terem lido minha dissertação e feito comentários que ajudaram na elaboração da mesma.

Aos meus amigos do laboratório: Tatiana, que me ajudou nas dificuldades do começo, que sempre está pronta a ajudar, que faz os melhores bolos, por ter dividido a alegria do nosso primeiro artigo, você tem sido uma companheirona! À Carlinha, minha primeira “pupila”, por toda ajuda e tempo dispendidos comigo, pela amizade e lealdade; ao Renato, pela sua calma, atenção, prontidão, e todas as canetas emprestadas! Ao Kaio, que mesmo novo no laboratório, sempre está disposto a ajudar.

À Dra. Silvia Berlanga e toda sua “turma”, que nos receberam muito bem desde o começo, e que fazem os dias de trabalho serem mais divertidos: Cris, Tânia, Vanessa, Fabriciano, Denise, Rebecca, Diogo e Daneila. Clarissa Kera por me ajudar inúmeras vezes e a Elisângela e a Dra. Ligia Gomes pela receptividade. Ao Fabio Nakano pela paciência e ajuda com os dados estatísticos.

À Dra. Mari Cleide Sogayar (IQ – USP/SP) pelo apoio na formação do nosso laboratório, aos seus alunos por sempre terem um tempinho livre para me auxiliar: Christian Colin, Ana Paula Hasegawa, Sheila Winnischofer, Marcos, Marina e Rita C.S. Figueira (por ter me disponibilizado os primers de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2); aos técnicos Zizi de Mendonça, Débora Cristina Costa, Ricardo Krett Oliveira pela excelente assistência técnica. À Marluce Mantovani por ter me ensinado a desenhar primers e ao Dr.

Roberto Sebatião Taboga (IBILCE – SJRP, São Paulo, SP) e seu técnico Luis Roberto Falleiros pela microscopia óptica do ensaio de invasão.

À Dra. Luisa Lina Villa pelas aulas estimulantes, por ter disponibilizado as linhagens celulares com as quais desenvolvi esta dissertação, pelas discussões dos meus dados; ao Dr. Enrique Boccardo por tirar muitas dúvidas e sempre estar disposto a responder meus muitos emails; aos dois pela leitura crítica do nosso artigo.

Aos meus pais, por toda paciência, dedicação, suporte nas épocas sem bolsa, por dividirem as alegrias e as tristezas do cotidiano do laboratório, vocês sempre me encorajaram a seguir esta carreira, para isto não tenho palavras para agradecer. À minha irmã Heloiza, pela sua lealdade imbatível, e que depois e muitas conversas começou a acreditar em DNA.

À minha tia Selma, por sempre acreditar em mim, e ao meu querido primo André, por achar minhas células lindas! À minha madrinha Edna, por me estimular desde pequena ser uma “cientista”. Aos meus tios Beto e Lúcia e aos tios de coração Rose e Zé Carlos que mesmo distantes me apóiam. À Vera que sempre me tem em suas orações.

Ao Arthur, por estar comigo em todos os momentos, por me esperar, não importa quantas horas sejam, até meus experimentos acabarem, pelas discussões filosóficas, por todo seu amor, carinho e compreensão, sem eles meus dias não seriam tão alegres!

Aos meus amigos que fui conquistando e mantendo durante minha vida, vocês tem sempre uma palavra de apoio e nunca me deixaram desistir. Que bom que vocês existem: Aninha, Luis, Carol, Mariana, Celinha, Priscila, Manuela, Ricardo, Hellen, Lia, Júlio, Alexandre e Patrícia.

Ao apoio financeiro do CNPq, Fapesp, CAPES, FINEP e PRP-USP.

RESUMO

Cardeal, L. B. S. **Associação entre alta expressão e atividade de metaloproteinases e presença de HPV em linhagens de carcinomas humanos.** 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A ação das metaloproteinases de matriz (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP) é necessária para degradação da membrana basal em carcinomas da cérvix uterina. O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da expressão das metaloproteinases MMP -2, -9 e MT1-MMP, do gene supressor de metástase RECK e do inibidor tecidual de MMPs (TIMP-2) em modelo de células de neoplasia da cérvix-uterina cultivadas em substratos de matriz extracelular. As linhagens celulares de carcinoma de cérvix uterina SiHa, CaSki, ambas HPV 16 positivas, e C33A, HPV negativa, foram cultivadas em gel de colágeno tipo I, Matrigel e plástico. Avaliou-se o crescimento, invasão, expressão gênica, através de ensaios de real-time PCR, e atividade de metaloproteinases, através de ensaios de zimografia. Os resultados demonstraram que estas linhagens de carcinoma cervical quando cultivadas em gel de colágeno tipo I apresentaram uma diminuição no crescimento, morfologia modificada na presença de substrato de matriz extracelular, e que nas linhagens HPV positivas há um aumento da expressão de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 e da atividade de pró-MMP-2 em relação à linhagem HPV negativa. Observou-se também que, RECK apresentou maior expressão gênica em CaSki associada à atividade de pró-MMP-2. MMP-9 apresentou muito baixa expressão gênica em todas as linhagens e condições estudadas. Quando analisamos as linhagens separadamente, observamos que o Matrigel influenciou a expressão gênica de MMP-2, e que o gel de colágeno tipo I aparece como indutor da atividade de pró-MMP-2 em todas as linhagens.

Em conclusão, nossos resultados mostram que a expressão de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 e que a atividade de pró-MMP-2 estão aumentadas nas células HPV positivas, sugerindo que o HPV está associado com a expressão de MMPs e TIMP-2.

Abstract

Cardeal, L. B. S. **Higher expression and activity of metalloproteinases is associated with HPV presence in human cervical carcinomas cell lines.** 2006. 88 f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Matrix metalloproteinases (MMPs) -2, -9, and MT1-MMP are required for basement membrane degradation in cervical carcinoma. We evaluated the expression and activity of MMPs and their inhibitors RECK and TIMP-2 in three human invasive cervical carcinoma cell lines. Two HPV-16- positive cell lines (SiHa and CaSki), HPV-negative cell line (C33A) were cultured either onto type-I collagen gel, Matrigel or plastic, in order to recreate their three-dimensional growth environment and evaluate the growth and invasion of the cells and expression of these genes using quantitative real-time PCR (Q-PCR). We also analyzed the gelatinolytic activity of MMP-2 and -9 by zymography. We found that the growth curves carcinoma cells are decreased and cells morphology are modified in ECM substrate. HPV-positive cell lines expressed higher levels of MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 than the HPV-negative cell line. In addition, MMP-9 was expressed at very low levels in both HPV-negative and HPV-positive cell lines. We also observed that the expression of the RECK gene is higher in CaSki cells, being associated with pro-MMP-2 activity. The Matrigel substrate influence MMP-2 expression for SiHa and CaSki cells. On the other hand, we found that type-I collagen gel, but not Matrigel, can enhance pro-MMP-2 activity in all cell lines. Our results suggest that the presence of HPV is related to increased expression of MMP -2, MT1-MMP and TIMP-2 and pro-MMP-2 activity in HPV-positive cells than in HPV-negative cells.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

	Página
Quadro 1: tempo de dobramento da linhagens de carcinoma cervical uterino	74
Quadro 2: Análise estatística dos dados de real-time PCR de <i>RECK</i>	75
Quadro 3: Análise estatística dos dados de real-time PCR de <i>MMP-2</i>	76
Quadro 4: Análise estatística dos dados de real-time PCR de <i>MT1-MMP</i>	77
Quadro 5: Análise estatística dos dados de real-time PCR de <i>TIMP-2</i>	78
Quadro 6: Análise estatística dos dados de zimografia	79
Quadro 7: Valores de expressão gênica de <i>RECK</i>	80
Quadro 8: Valores de expressão gênica de <i>MMP-2</i>	80
Quadro 9: Valores de expressão gênica de <i>MMP-9</i>	81
Quadro 10: Valores de expressão gênica de <i>MT1-MMP</i>	81
Quadro 11: Valores de expressão gênica de <i>TIMP-2</i>	81
Figura 1: Mecanismos de ação de <i>RECK</i> na regulação das MMPs .	24
Figura 2: Perfil do crescimento das linhagens celulares de carcinoma cervical cultivadas em diferentes substratos.	40
Figura 3: Aspecto morfológico das células SiHa, CaSki e C33A cultivadas por 5 dias, observadas em microscopia de contraste de fase, cultivadas em diferentes substratos. (P) plástico, (C) colágeno e (M) matrigel.	41
Figura 4: Ensaio de Invasão em colágeno	42
Figura 5: Expressão gênica de <i>RECK</i> normalizada por <i>GAPDH</i>	45
Figura 6: Expressão gênica de <i>MMP-2</i> normalizada por <i>GAPDH</i>	46
Figura 7: Expressão gênica de <i>MMP-9</i> normalizada por <i>GAPDH</i>	47
Figura 8: Expressão gênica de <i>MT1-MMP</i> normalizada por <i>GAPDH</i>	48
Figura 9: Expressão gênica de <i>TIMP-2</i> normalizada por <i>GAPDH</i>	49
Figura 10: Gel de zimografia com atividades das pró-MMPs -2 e -9, seu inibidor e MMPs recombinantes, para as linhagens SiHa, CaSki e C33A cultivadas nos diferentes substratos	51
Figura 11: Quantificação das atividades das pró-MMPs.	52
Figura 12: Curvas de dissociação de <i>GAPDH</i> após reação de <i>real-time</i> PCR	82
Figura 13: Curvas de dissociação de <i>RECK</i> após reação de <i>real-time</i> PCR	82
Figura 14: Curvas de dissociação de <i>MMP-2</i> após reação de <i>real-time</i> PCR	83
Figura 15: Curvas de dissociação de <i>MMP-9</i> após reação de <i>real-time</i> PCR	83
Figura 16: Curvas de dissociação de <i>MT1-MMP</i> após reação de <i>real-time</i> PCR	84
Figura 17: Curvas de dissociação de <i>TIMP-2</i> após reação de <i>real-time</i> PCR	84
Figura 18: Validação da expressão gênica de <i>RECK</i>	85
Figura 19: Validação da expressão gênica de <i>MMP-2</i>	85
Figura 20: Validação da expressão gênica de <i>MMP-9</i>	86
Figura 21: Validação da expressão gênica de <i>MT1-MMP</i>	86
Figura 22: Validação da expressão gênica de <i>TIMP-2</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCUS - células escamosas atípicas com significado indeterminado

AP-1 – proteína ativadora 1

ATCC- American tissue and cell collection

BSA – albumina de soro bovino

bFGF- fator de crescimento básico de fibroblastos

C - colágeno tipo 1

CA-MEK – proteína mitogênica-ativada quinase ERK

cDNA- DNA obtido por transcrição reversa, a partir de RNA

Ct – limiar do ciclo

DME – ‘Dubelcco’s Modified Eagle’s’

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxiribonucléico

2D - bidimensional

EBV - Epstein-Barr vírus

EDTA – ácido etileno dinitrilo tetracético

ERK - quinases reguladoras de sinal extracelular

E2 – proteína viral precoce 2

E4 - proteína viral precoce 4

E5 - proteína viral precoce 5

E6 - proteína viral precoce 6

E7 - proteína viral precoce 7

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GPI – glicosil fosfatidil inositol

HDAC - histona desacetilases

HE- hematoxilina-eosina

HPV - papilomavírus humano

HSIL - lesão intraepitelial escamosa de alto-grau

hTert - transcriptase reversa da telomerase humana

IL-6 - interleucina 6

INCA - **Instituto** Nacional de Câncer

kDa- kilodaltons

LMP1 - proteína latente de membrana 1

LSIL - lesão intraepitelial escamosa de baixo-grau

L1 - proteína estrutural 1

L2 - proteína estrutural 2

M - **matrigel**

MEC - **matriz** extracelular

MLH-1 - mutL homolog 1

MMPs - metaloproteinases de matriz

MPIs – Inibidores de metaloproteinases

MT-MMP – metaloproteinases de matriz ligadas à membrana

MT1-MMP - metaloproteinase 1 do tipo de membrana

NIC - neoplasia intra-epitelial cervical

NOTCH-1 - Notch homolog 1, associado a translocação

P - plástico

PBSA – tampão fosfato livre de cálcio e magnésio

PCR - reação da polimerase em cadeia

RECK – reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

RNA - ácido ribonucleico

RT-PCR – transcrição reversa

S – síntese

SCC - carcinoma escamoso invasivo

SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio

SPI-like – inibidor de serina protease “like”

TA – temperatura ambiente

TGF-alfa - fator de crescimento transformante alfa

TSA - tricostatina A

TIMP - inibidores teciduais de metaloproteases

3D - tridimensional

VEGF - fator de crescimento endotelial de vasos

VLPs – partículas semelhantes ao vírus

SUMÁRIO

	Página
1.Introdução	
1.1 Neoplasias da Cérvix Uterina	13
1.2 O Papel das MMPs na Progressão dos Tumores Cervicais	16
1.3 Inibidores de Metaloproteinases	19
1.4 O Gene Supressor de Metástase/Angiogênese <i>RECK</i> .	21
2. Objetivo geral	28
3. Objetivos específicos	28
3.1 Caracterização, <i>in vitro</i> , das linhagens celulares estabelecidas de neoplasia de cérvix uterina	28
3.2 Avaliação da expressão dos genes <i>RECK</i> , <i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> , <i>MT1-MMP</i> e <i>TIMP-2</i> .	28
3.3 Avaliação de atividades de MMPs..	28
4. Material e métodos	29
4.1 Linhagens celulares	29
4.2 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.	29
4.3 Preparo dos substratos de Matriz Extracelular	30
4.4 Curvas de crescimento	30
4.5 Ensaio de Invasão em colágeno	31
4.6 Extração de RNA total	32
4.7 Real-Time PCR	33
4.7.1 Preparação dos cDNAs	33
4.7.2 Teste da eficiência da transcrição reversa	33
4.7.3 Reação de Real Time PCR	34
4.8 Zimografia	36
4.8.1.Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura	36
4.8.2 Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina	37
4.8.3 Incubação e revelação do gel	37
4.9 Análise estatística.	38
5. Resultados	39
5.1 Caracterização das linhagens SiHa, CaSki e C33A.	39
5.2 Expressão gênica de <i>RECK</i> , <i>TIMP-2</i> , <i>MMP-2</i> , <i>-9</i> e <i>MT1-MMP</i> em linhagens celulares de carcinoma cervical	43
5.3 Atividade de <i>MMP-2</i> e <i>MMP-9</i>	50
6. Discussão	53
7. Referências Bibliográficas	61
Apêndice A Tempo de dobramento das linhagens de carcinoma cervical uterino	74
Apêndice B Análises estatísticas dos dados de <i>Real-time</i> PCR e Zimografia	75
Apêndice C Valores absolutos de expressão gênica	80
Apêndice D Curvas de dissociação de cada gene analisado	82
Apêndice E Gráficos referentes à validação da análise de expressão utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)	85

1) Introdução

1.1) NEOPLASIAS DA CÉRVICE UTERINA

Os tumores da cérvix uterina são uma das maiores doenças ginecológicas em mulheres na idade reprodutiva, sendo o segundo tipo de câncer em número de mortes entre mulheres na faixa etária dos 20 aos 39 anos (Jemal et al, 2005). Além disso, é o terceiro tipo mais comum na população feminina, superado pelo câncer de pele não-melanoma e de mama (INCA, 2006) representando aproximadamente 12% dos casos de câncer em mulheres em todo o mundo (zur Hausen, 2002; Wright et al, 2003). No Brasil, o câncer de colo do útero apresenta para 2006 uma estimativa de 19.260 novos casos, sendo o tumor mais incidente na região Norte e está entre os cinco mais incidentes nas demais regiões do país (INCA, 2006). A taxa de mortalidade mundial é de 51%, fazendo com que o câncer de colo do útero continue sendo um importante problema de saúde pública (Zhai et al, 2005).

O principal fator de risco associado aos tumores da cérvix uterina é a exposição ao vírus HPV, o papilomavírus humano. Segundo Walboomers et al, 1999, a prevalência mundial de HPV em casos de carcinomas cervicais invasivos é de 99,7 %, fazendo o HPV ser a etiologia do câncer cervical (Bosch & Muñoz, 2002). Embora o HPV seja essencial para a transformação das células epiteliais cervicais, sua presença não é suficiente. Uma grande variedade de eventos moleculares e co-fatores podem influenciar neste processo como: cigarro; disfunções no sistema imunológico; o número de parceiros; o início precoce da atividade sexual; alto número de paridade, relativa a partos normais; uso prolongado de contraceptivos orais e a infecção por outro agente transmitido sexualmente exemplificado pela *Chlamydia trachomatis* (Castellsague et al, 2002; Villa et al, 2002; Bosch & Muñoz, 2002; Burd, 2003; Rabelo-Santos et al, 2003; Waggoner, 2003; de Jong et al, 2004).

Antes de seu desenvolvimento, o câncer cervical é precedido por mudanças na cérvix uterina, principalmente na zona de transformação, denominada de junção epitélio escamo-

colunar (Jordan & Monaghan, 2004). O nome dado a estas anormalidades celulares é neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), a qual pode também ser descrita como displasia.

A progressão do câncer cervical é contínua, e de acordo com a mais nova classificação de Bethesda (Solomon & Nayar, 2004), a transição neoplásica da lesão intraepitelial escamosa (SIL), ocorre das lesões intraepiteliais escamosas de baixo-grau (LSIL =NIC I) para lesões intraepiteliais escamosas de alto-grau (HSIL), que incluem NIC II, NIC III e carcinoma *in situ*, e finalmente para carcinoma escamoso invasivo (SCC). O tempo de progressão de LSIL para HSIL em pacientes é de 6 anos para infecções com HPV oncogênico, no entanto, metade das LSILs regredem para normalidade ou ASCUS (células escamosas atípicas com significado indeterminado) no período de 6 meses (Schlecht et al, 2003).

A associação entre HPV e NIC é bastante robusta e quase inequívoca. A infecção por HPV é restrita primariamente a células do epitélio escamoso e a quase todos os tipos de carcinomas como os de vulva, vagina e pênis, mas é raramente detectado em tumores de endométrio, pulmão e ovário (Plaza et al, 2004).

A transformação de uma neoplasia não-invasiva em um carcinoma invasivo de cérvix uterina está acompanhada inicialmente por uma interrupção tecidual focal seguida pela degradação da membrana basal pela ação de proteases. Os carcinomas escamosos microinvasivos (profundidade de invasão menor que 3 mm) possuem uma taxa de metástase menor que 1% e uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 100%. Quando o tumor invade mais que 5 mm em direção à submucosa, fica confinado na cérvix e penetra nos microvasos, a taxa de sobrevida em 5 anos cai para 50% (Nuovo et al, 1995, 1997). Níveis alterados e desequilíbrio na distribuição das proteases representam um aumento no potencial invasivo (Brummer et al, 2002).

É estimado que apenas 12% a 22% das lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) persistem ou progridem para carcinoma invasivo (Shah et al, 1996). Cerca de 75% das mulheres controlam a infecção, eliminando o vírus no período de 12 meses (Franco et al, 1999).

Apenas 5% das pacientes apresentam metástase após diagnóstico de lesão primária (Ikenberg, 1993). Pacientes que apresentam NIC podem não desenvolver a doença, entretanto as NICs são quase sempre resultado de infecção pelo vírus HPV (Walboomers et al, 1999).

Existem cerca de mais de 100 tipos de HPV, entre os quais se encontram os de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), os de provável alto risco (26, 53 e 66) e os de baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81). (Muñoz et al, 2003, de Villiers et al, 2004). A probabilidade de desenvolvimento de neoplasia aumenta devido à infecção persistente por HPV de alto risco.

Em um estudo realizado por Rabelo-Santos et al, 2003, em mulheres brasileiras que apresentavam NIC 3 e carcinomas invasivos, mostrou-se que a prevalência de HPV é de 76% entre esses tumores. O HPV do tipo 16 foi o que apresentou maior frequência nesses casos e na população brasileira como um todo. O HPV do tipo 18 é o segundo mais prevalente nas populações das regiões Norte, Sudeste e Sul do Brasil, e os tipos 31 e 33 estão em segundo lugar nas populações das regiões Nordeste e Central do Brasil, respectivamente (Rabelo-Santos et al, 2003). Segundo Sun et al (1999), 47,4% das pacientes brasileiras com carcinoma invasivo de cérvix apresentaram resultado positivo no exame ELISA para partículas semelhantes a proteínas virais (VLPs –virus-like particles, como L1, L2, E2 e E7) produzidas por HPV do tipo 16.

Lesões pré-existentes na região cervical persistem por mais tempo e progridem mais rapidamente em mulheres infectadas com HPVs oncogênicos de alto risco do que em mulheres infectadas com HPV não-oncogênicos, de baixo risco, ou não infectadas (Schlecht et al, 2003). O tempo de depuração (“clearance”) nas pacientes infectadas é maior para HPVs oncogênicos do que para os não-oncogênicos (Wolf et al, 2003).

Mulheres que são DNA e mRNA positivas para os oncogenes e transcritos das oncoproteínas virais E6 e E7, do HPV são mais predispostas à infecção persistente pelo vírus do que mulheres que só são DNA positivas (Cuschieri et al, 2004). A proteína E6 causa

degradação do produto do gene supressor de tumor p53 e a proteína E7 desestabiliza a proteína Rb (gene supressor de tumor pRb), ambas por induzirem degradação através da via ubiquitina-proteassomo, levando a um aumento de ciclinas B e E que promovem progressão do ciclo celular (Swanton & Jones, 2000; Heilmann & Kreienberg, 2002). Todos os tipos de HPV possuem os oncogenes E6 e E7, que são homólogos entre os tipos, mas não idênticos. Desta forma, as proteínas virais dos tipos considerados de baixo risco possuem menor afinidade pelas proteínas dos genes supressores de tumor da célula hospedeira.

1.2) O PAPEL DAS MMPs NA PROGRESSÃO DOS TUMORES CERVICAIS

A matriz extracelular (MEC) tem um papel fundamental na estrutura e homeostase tecidual. Os principais componentes protéicos da MEC são o colágeno e as fibras elásticas, os quais são produzidos e secretados por um grande número de células estromais, sendo necessários para a organização de tecidos. Outras proteínas contribuem para estruturas especializadas da MEC como a membrana basal, que também possui laminina, entactina e colágeno tipo IV. A segunda classe de proteínas que compõe a MEC são as proteoglicanas, como a condroitin, heparina e keratanin sulfato. As proteoglicanas estão relacionadas com a adesão celular e ligação a fatores de crescimento. A MEC também contém glicosaminoglicanas, sendo o ácido hialurônico o principal representante, relacionando-se com a adesão e a sinalização celular. Juntos, esses componentes de matriz extracelular formam uma estrutura que mantém a integridade tecidual, regulam a migração celular e formam um reservatório de fatores de crescimento e citocinas (Egeblad & Werb, 2002; Stamenkovic, 2003; Hojilla et al., 2003).

As interações epitélio-estroma desempenham um papel crítico durante o desenvolvimento e manutenção da homeostasia tecidual. Cada tipo celular apresenta determinados receptores para o seu microambiente e as interações destes receptores com a MEC influenciam a forma, o desenvolvimento e a resposta celular a moléculas solúveis, incluindo citocinas, fatores de crescimento e sua interação com o interior celular via integrinas,

assim como descrito no clássico modelo de reciprocidade dinâmica de Lin & Bissell, 1993, o qual mostra que a MEC emite sinais para o núcleo e vice-versa (Bissell et al, 2003).

O microambiente extracelular possui sinais regulatórios que afetam importantes processos como adesão celular, diferenciação, divisão e apoptose. Quando há alteração dessas funções devido à ação de proteinases, a interação célula-célula e célula-matriz extracelular se altera e novos sinais são gerados para superfície celular, levando a célula a expressar genes que podem atuar na diferenciação, sobrevivência, proliferação e motilidade celular (Sternlicht & Werb, 2001; Bissell et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Hojilla et al, 2003; DeClerck et al, 2004).

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares, que incluem as serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteinases dependentes de zinco (MMPs), enzimas-chave que são responsáveis pela degradação da MEC e que exercem um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão de neoplasias humanas. No câncer, a regulação alterada da proteólise favorece a degradação da MEC e consequentemente a metástase (Benaud et al, 1998; Itoh & Nagase 2002; Baker et al, 2002; Mysliwiec et al, 2002; Singer et al, 2002).

As MMPs compreendem um grupo de enzimas proteolíticas dependentes de Zn^{2+} (endopeptidases) que, de acordo com a especificidade do substrato, foram historicamente subdivididas em collagenases, gelatinases, elastases, estromelisinases (Benaud et al, 1998; Sternlicht & Werb, 2001; Brummer et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002). Atualmente, as 25 MMPs conhecidas são classificadas de acordo com sua estrutura. Existem oito classes estruturais de MMPs: cinco são secretadas e três são MMPs tipo-membrana (MT-MMPs). As MT-MMPs são ligadas covalentemente a membrana celular, enquanto as MMPs secretadas localizam-se na superfície celular através de ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (Chang & Werb, 2001; Sternlicht & Werb, 2001; Egeblad & Werb, 2002).

As MMPs são secretadas como zimógenos inativos (pro-MMP) e sua ativação requer uma clivagem proteolítica que remove os 80 resíduos do domínio amino-terminal. O domínio catalítico contém um sítio ativo de ligação ao zinco, que possui três histidinas conservadas (Woodhouse et al, 1997; Sternlicht & Werb, 2001; Nabeshima et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Polette et al, 2004). As MMPs secretadas são ativadas extracelularmente por outras MMPs ativas ou por serina-proteinases, enquanto as MT-MMPs são ativadas intracelularmente (Nabeshima et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002).

A degradação da MEC por MMPs não apenas facilita a invasão tumoral mas, também, afeta o comportamento da célula tumoral e conduz a progressão do câncer (Itoh & Nagase, 2002). Evidências sugerem que MMPs também possuem atividade angiogênica e participam dos primeiros estágios da tumorigênese e do crescimento do tumor primário (Sternlicht & Werb, 2001; Baker et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Yoon et al, 2003). Além de degradarem a MEC eliminando, portanto, a barreira física para a migração celular, MMPs como MMP-9 aumentam a biodisponibilidade de fatores pro-angiogênicos, a MMP-2 expõe sítios críticos de ligação que permitem a migração de células endoteliais enquanto a MT1-MMP facilita a inserção de células endoteliais no tecido tumoral, levando à formação de capilares e vaso sanguíneos (Egeblad & Werb, 2002 ; Mannello et al, 2005).

Estudos em humanos mostram uma associação direta entre aumento da expressão de MMPs e invasividade tumoral, desenvolvimento de metástases, recorrência de tumores e baixa taxa de sobrevivência (Mysliwiec et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Sheu et al, 2003).

Níveis elevados de diferentes MMPs podem ser detectados nos tecidos tumorais ou no soro de pacientes em estágios de câncer avançado e seu papel como indicador de prognóstico em neoplasias vem sendo estudado (Sheu et al, 2003; La Rocca et al, 2004). As MMPs não são produzidas apenas pelo epitélio maligno mas, também, pelo estroma adjacente, incluindo fibroblastos, miofibroblastos, células inflamatórias e células endoteliais, sugerindo um importante

papel da interação célula-célula (Singer et al, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Mareel & Leroy, 2003).

Alguns trabalhos descrevem em carcinomas escamosos da cérvix uterina a degradação da MEC, com ação das MMPs (MMP-2 e MMP-9), no processo de invasão, permeação linfovascular, metástase (nodal) e recorrência de tumores (Brummer et al, 2002; Zhou et al, 2002; Sheu et al, 2003). É observado que durante a progressão tumoral, há um aumento significativo da produção de MMPs pelas células epiteliais malignas e pelas células do estroma peritumoral. Quando a razão MMPs/TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinase) aumenta, há uma correlação com pior prognóstico, mostrando uma maior invasividade do tumor (Nuovo et al, 1995; Brummer et al, 2002; Sheu et al, 2003).

Brummer et al, 2002, descreveram a expressão de MMP-2 em lesões pré-invasivas de cérvix uterina e uma consecutiva co-expressão de MMP-1 e MMP-2 em tumores invasivos, que sugerem um gradual aumento no potencial invasivo. Também foi relatado que a expressão de MMP-2, quando observado em lesões intraepiteliais de alto grau, pode indicar tumores com um risco aumentado de invasão. Muitos trabalhos propõem a associação entre MMPs (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP) e o potencial maligno das neoplasias humanas de cérvix (Nuovo et al, 1995; Gilles et al, 1996; Davidson et al, 1999; Brummer et al, 2002; Sheu et al, 2003; Gaiotto et al, 2004; Zhai et al, 2005)

1.3) INIBIDORES DE METALOPROTEINASES

As metaloproteinases regulam processos celulares normais e patológicos, desta forma, sua expressão e ativação devem ser finamente controladas para que sua atividade enzimática ocorra sincronicamente em um balanço entre concentração e tipo celular.

A atividade das MMPs pode ser regulada através de mecanismos endógenos como transcrição, ativação por outras MMPs maduras e inibição. Entre os inibidores endógenos podemos destacar a $\alpha 2$ macroglobulina, presente no plasma e tecidos fluidos, a qual se liga as MMPs promovendo a retirada deste complexo via endocitose; as trombospondinas, que se

ligam à MMP-2 e MMP-9 promovendo seu *clearence* via endocitose e bloqueando suas atividades proteolíticas; os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), pequenas moléculas com domínios “TIMP-like” e a recente descrita glicoproteína de membrana RECK (Overal & López-Otín, 2002; Mannello et al, 2005).

As TIMPs, que são identificadas em quatro tipos (TIMP-1 a TIMP-4) inibem as MMPs de uma forma seletiva, reversível, não covalente e com estequiometria molecular na razão 1:1 (Chang & Werb, 2001, Overal & López-Otín, 2002). TIMP-1 inibe a ação de collagenases, estromelesina-1 e as formas ativas e inativas de MMP-9 (gelatinase B); TIMP-2 inibe a pro-MMP-2 (gelatinase A), modulando sua ativação. Baixas concentrações de TIMP-2 estão associadas com MT1-MMP no processo de ativação de MMP-2, no entanto, altas concentrações inibem diretamente tanto MMP-2 quanto MT1-MMP; TIMP-3, ao contrário das três outras formas que são solúveis, está associada com a MEC e inibe pro-MMP- 2/-9 e TIMP-4 inibe pro-MMP-2. (Woodhouse et al, 1997; Fassina et al, 2000; Baker et al, 2002; Lafleur et al, 2003; Shiomi & Okada, 2003).

O balanço entre proteases e seus inibidores determina o potencial proteolítico dos tumores e uma diminuição nos níveis de TIMPs está geralmente associada com tumorigênese (Overal & López-Otín, 2002). Entretanto, existem vários exemplos nos quais a expressão de TIMPs está aumentada durante a progressão tumoral, o que seria esperado para uma redução do potencial tumoral, podendo ser considerado como uma resposta de proteção pelo estroma (Overal & López-Otín, 2002; Mannello et al, 2005).

A expressão e atividade de MMPs estão associadas com a invasão tumoral e metástase, além disso, está claro atualmente que estas proteases também atuam nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, participando diretamente da geração de sinais que induzem a proliferação tumoral e a inibição da apoptose. Neste contexto, as MMPs são um alvo para possíveis terapias contra o câncer, e muitas estratégias envolvendo a inibição das MMPs têm sido testadas em modelos experimentais e em testes clínicos. Entre essas estratégias podemos

citar: a) bloqueio da transcrição gênica, baseado em fatores extracelulares, vias de transdução de sinal e fatores nucleares através de ribozimas e construções antisense; b) bloqueamento da atividade de MMPs, baseado na ativação das pro-MMPs e nas interação das MMPs entre si e com outros alvos através de componentes que inibem a ativação e a interação das MMPs (Overal & López-Otín, 2002; Mannello et al, 2005).

Os primeiros testes clínicos que utilizaram as TIMPs como tratamento, no entanto, seu uso é extremamente limitado, uma vez que são proteínas multifuncionais, atuando em outros processos biológicos independentes da inativação das MMPs (Lafleur et al, 2003; Mannello et al, 2005). Muitos inibidores sintéticos como Batimastat, Marimastat, Tamomastat, Metastat entre outros, e inibidores naturais como Neovastat, catequinas extraídas do chá verde e ácido acetilsalicílico têm sido utilizados em testes clínicos, mas assim como os inibidores endógenos, apresentaram muitos efeitos colaterais, devido principalmente, ao amplo espectro de atuação desses fármacos (Overal & López-Otín, 2002; Mannello et al, 2005). No entanto, quando alguns destes inibidores foram co-administrados com agentes citotóxicos em pacientes em estágios iniciais de desenvolvimento tumoral, foi observada uma diminuição do crescimento tumoral, angiogênese e metástase (Lafleur et al, 2003).

Apesar dos testes pré-clínicos terem apresentados resultados promissores, a experiência com testes clínicos de Fase III não mostra nenhum benefício para os pacientes que foram tratados com MPIs (Metalloproteinases Inhibitors), pois em alguns casos, estes pacientes apresentaram piora em seu quadro clínico comparados com aqueles que foram tratados com placebo (Mannello et al, 2005).

1.4) O GENE SUPRESSOR DE METÁSTASE/ANGIOGÊNESE RECK

O fenômeno da reversão de células transformadas e tumorais para um fenótipo normal tem permitido abordar o papel de oncogenes e de genes supressores de tumor não só no

controle da proliferação celular normal como, também, na transformação celular, e nos mecanismos de transdução de sinais (Noda,1993a).

Com o objetivo de estudar os mecanismos moleculares envolvidos na transformação isolou-se e caracterizou-se cDNAs, os quais, quando super-expressos, induziam a reversão fenotípica da linhagem DT, uma sub-linhagem de células NIH-3T3 transformadas com v-Ki-Ras (Noda et al, 1983, 1989; Kitayama et al, 1989; Noda et al, 1993b; Takahashi et al, 1996, 1998). Utilizando esta abordagem, foi isolado um cDNA que codifica uma nova glicoproteína de membrana com aproximadamente 110 kDa denominada RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) (Takahashi et al,1998).

Tanto o cDNA humano quanto o de camundongo codificam uma proteína composta por 971 resíduos de aminoácidos, demonstrando uma identidade de 93% entre si. A proteína RECK é rica em cisteína (9,2%), sugerindo uma estrutura secundária complexa que contém regiões hidrofóbicas tanto na região NH₂ - terminal quanto na região COOH- terminal. A sequência peptídica da proteína humana madura expressa em células de mamíferos indica que a região NH₂ - terminal hidrofóbica (26 resíduos) funciona como um peptídeo sinal enquanto que a região COOH- terminal parece funcionar como âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pela qual RECK é ancorada à membrana plasmática. A porção mediana da proteína contém três domínios semelhantes aos inibidores de serina-proteases (domínio SPI-like), sendo que um deles é condizente com a sequência consenso do motivo Kazal (C-X₇-C-X₆-Y-X₃-C-X_{2,3}-C), o qual está relacionado com inibição de proteinases (NCBI, 2005). Além disso, foram detectadas duas regiões de repetição de fraca homologia com o fator de crescimento epidérmico, motivos de cisteína na região NH₂ – terminal e cinco sítios com potencial de glicosilação (Takahashi et al, 1998; Noda, 2003).

O gene *RECK* é expresso em diversos tecidos humanos normais, porém, sua expressão é reprimida durante a transformação celular, uma vez que a expressão deste gene não foi detectada nas inúmeras linhagens tumorais analisadas (Takahashi et al, 1998, Masui et al,

2003). Segundo Takahashi et al, 1998, a supressão da atividade invasiva e metastática foi observada em ensaios de superexpressão do gene *RECK* nas linhagens celulares tumorais HT1080 (fibrosarcoma humano) e B16-BL6 (melanoma de camundongo).

Durante a transformação celular, a expressão do gene *RECK* é inibida, resultando em secreção e atividade aumentada de MMPs, as quais contribuem para a transformação morfológica e o comportamento invasivo das células tumorais (Takahashi et al, 1998).

Através de ensaios bioquímicos, foi mostrado que a proteína RECK purificada se liga a MMP-9 e inibe a sua atividade proteolítica, por meio de um mecanismo ainda não explorado, sendo possível a formulação do seguinte modelo: em células normais, a secreção de MMP-9 está bloqueada pela ligação da mesma à proteína RECK, a qual está ancorada na membrana plasmática. Durante o processo de transformação celular, a expressão do gene *RECK* é inibida, resultando em liberação de MMP-9, a qual irá contribuir para a transformação morfológica e o comportamento invasivo de células tumorais (Takahashi et al, 1998). Relatos recentes mostraram que RECK regula negativamente, além da MMP-9, duas outras MMPs: MMP-2 e MT1-MMP. Ensaios de atividade proteolítica mostraram que na presença de RECK, a atividade de MT1-MMP diminuiu de uma maneira dose-dependente e que a atividade de MMP-2 foi inibida competitivamente, assim como MMP-9 (Oh et al, 2001). A figura 1 mostra a regulação das MMPs por RECK.

Uma das características exclusivas de RECK que o torna um novo tipo de inibidor de MMPs, é o fato da proteína RECK apresentar um domínio GPI e, portanto estar localizada na membrana, diferentemente da TIMPs que são secretadas (Oh et al, 2001). Várias MMPs têm alvos na região pericelular, seja por alguma âncora diretamente na membrana ou por receptores ou ainda por proteínas ligantes na superfície celular, criando assim uma região de alta atividade proteolítica. Esta área com ação proteolítica concentrada pode funcionar para a invasão celular bem como na sinalização localizada de fatores de crescimento por interações com moduladores ligantes da MEC. Além disso, a ativação de algumas MMPs requer interação com outras MMPs

associadas à membrana (MT-MMPs), como pode ser exemplificado pelo processo de ativação de MMP-2: uma molécula de TIMP-2 liga-se a pró-MMP-2 e à MT1-MMP; em seguida, uma segunda molécula de MT1-MMP cliva uma porção do pró-domínio de MMP-2 para liberar a sua forma intermediária; por fim, outra clivagem do pró-domínio de MMP-2 por uma MMP-2 livre resulta na forma ativa da MMP-2 (Welm et al, 2002). O fato de RECK estar localizada na região pericelular torna sua atividade inibitória potencializada.

Figura 1: RECK modula a ação de MMP-9 (a), MT1-MMP (b) e MMP-2 (c) através de vários mecanismos como inibição da ativação das pro-MMPs e inibição da atividade das MMPs. Retirado e modificado de Rhee & Coussens, 2002.

Foi descrito que o restabelecimento da expressão de *RECK* em linhagem HT1080 de fibrosarcoma resulta em uma diminuição da secreção tanto da forma intermediária, quanto da forma ativa de MMP-2, sugerindo que RECK regula a ativação da ProMMP-2 por inibir duas enzimas proteolíticas necessárias para o seu processamento, especificamente as enzimas MT1-MMP e a própria MMP-2 ativa (Oh et al, 2001).

Em um recente trabalho com linhagens celulares de glioblastomas multiformes humanos, observou-se através de ensaios de *real-time* PCR e zimografia que a linhagem invasiva T98G apresentou uma menor expressão gênica de *RECK* associada a uma maior expressão gênica de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP* e maior atividade das MMPs -2 e -9. No entanto, a linhagem não invasiva A172 apresentou o perfil de expressão e atividade opostos, isto é, observou-se maior expressão de *RECK* e menor atividade de MMPs, mostrando que RECK regula negativamente essas MMPs (Corrêa et al, 2006).

As funções biológicas de RECK *in vivo* foram exploradas através de experimentos com camundongos “knock-out” e de ensaios de tumorigenicidade em camundongos “nude” (Oh et al, 2001). Camundongos nos quais a proteína RECK funcional está ausente morrem em torno do décimo dia da fase embrionária com deficiências de fibras colágeno, desorganização da lâmina basal e redução da integridade do sistema vascular, tubo neural e tecido mesenquimal (Oh et al, 2001; Noda et al, 2003). Este fenótipo foi parcialmente suprimido pelo “knock-out” do gene correspondente à MMP-2 (camundongo apresenta menor angiogênese e crescimento tumoral em relação ao controle) (Egeblad & Werb, 2002), indicando que a regulação da atividade de MMP-2 mediada por RECK tem um papel fisiológico.

Durante o desenvolvimento, os resultados sugerem que RECK tenha papel importante como regulador de metaloproteinases, inibindo a atividade das mesmas e propiciando, desta forma, o acúmulo necessário de colágeno para um desenvolvimento embrionário normal (Oh et al, 2001), além de ser necessário para a maturação vascular durante o processo de embriogênese (Welm et al, 2002).

Ensaio de tumorigenicidade em camundongos “nude” sugerem que RECK inibe a angiogênese tumoral, uma vez que as ramificações foram dramaticamente suprimidas nos tumores gerados a partir de células de fibrosarcoma que expressavam *RECK*. É interessante notar que camundongos “nude” que desenvolveram tumores a partir de células de fibrosarcoma expressando o gene *RECK* constitutivamente apresentaram maior sobrevida quando comparados àqueles que desenvolveram o tumor controle (ausência da expressão de *RECK*) (Oh et al, 2001).

Os resultados obtidos até o momento, sugerem que RECK inibe a atividade de MMPs, consequentemente, a invasão tumoral, metástase e angiogênese tumoral (Takahashi et al, 1998; Oh et al, 2001; Sasahara et al, 2002) podendo, portanto, ser alvo promissor para a prevenção e o tratamento de câncer.

Em um modelo de carcinoma nasofaríngeo, foi observado que RECK está atuando na interação câncer-vírus, pois a linhagem TW04 (carcinoma nasofaríngeo) infectada pelo Epstein-Barr vírus (EBV), possui uma maior produção de MMP-9 e apresenta um fenótipo invasivo e metastático devido ao papel da proteína viral LMP1 (latent membrane protein - proteína latente de membrana 1) ao reprimir a transcrição do sítio Sp1 do promotor de *RECK* (Liu et al, 2003a).

O sítio Sp1 do promotor de *RECK* além de ser um alvo para proteínas virais, também é reprimido por *ras*. Está proposto que o oncogene *ras* ativa ERK (quinases reguladoras de sinal extracelular - extracellular signal-regulated kinases) a qual fosforila HDACs (histona desacetilases- histone deacetylases), induzindo a ligação dessas enzimas o sítio Sp1 de *RECK*, suprimindo sua expressão (Chang et al, 2004). Em células de pulmão CL-1 foi observado que o tratamento com tricostatina A (TSA), um inibidor de histona desacetilases, houve uma diminuição do potencial invasivo, inibição da atividade de MMP-2 e aumento da expressão de RECK, sugerindo a ação das HDACs sobre o promotor de *RECK* (Liu et al, 2003b).

Embora *RECK* seja um gene recentemente descrito (Takahashi et al, 1998), toda literatura gerada até o presente momento relata a possibilidade de utilização deste gene como marcador molecular de melhor prognóstico para pacientes que apresentam tumores do tipo carcinomas pancreático, mamário, prostático, pulmonar, colo-retal e hepatocarcinoma. Nestes estudos correlaciona-se a presença de *RECK* com melhor prognóstico, tendência de menor invasividade tumoral e maior taxa de sobrevida dos pacientes. (Span et al, 2003; Masui et al, 2003; Furomoto et al; 2001; Takeuchi et al, 2004; Takenaka et al, 2004; Riddick et al, 2005).

Dada a alta incidência das neoplasias cervicais em todo o mundo, especialmente no Brasil e a necessidade constante da busca de novos fármacos e terapias que propiciem maior sobrevida a pacientes, nós objetivamos estudar a expressão dos genes inibidores de MMPs *RECK* e *TIMP-2*, bem como seus alvos *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, os quais participam de processos invasivos e metástases em diferentes modelos tumorais.

Conhecendo-se a ação de MMPs no processo invasivo e poder inibitório das proteínas *RECK* e *TIMP-2*, nossos dados poderão contribuir através deste estudo para expansão da correlação entre invasividade e expressão destes genes em neoplasias do epitélio do colo do útero na presença e ausência do vírus HPV.

2) Objetivo Geral

O objetivo deste estudo consistiu na avaliação do papel das metaloproteinases MMP -2, -9 e MT1-MMP, do gene supressor de metástase RECK e do inibidor tecidual de MMPs (TIMP-2) em modelo de células de neoplasia da cérvix-uterina quando cultivadas em substratos de matriz extracelular.

3) Objetivos específicos

3.1) Objetivo 1: Caracterização *in vitro* das linhagens celulares estabelecidas de neoplasia de cérvix uterina, através de curvas de crescimento e ensaios morfológicos.

3.2) Objetivo 2: Caracterização da expressão dos genes MMP -2, -9, MT1-MMP, RECK e TIMP-2 nas linhagens celulares de neoplasias cervicais, CaSki e SiHa (HPV positivas), C33A (HPV negativa) quando cultivadas em diferentes substratos, quanto aos níveis de mRNA através de ensaios de Q-PCR.

3.3) Objetivo 3: Caracterização da atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) nas linhagens celulares de neoplasias cervicais, CaSki e SiHa (HPV positivas), C33A (HPV negativa) quando cultivadas em diferentes substratos, através de ensaios de zimografia.

4) Material e Métodos

4.1) Linhagens Celulares (doadas pela Dra. Luísa Lina Villa, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer – SP/Brasil).

- SiHa: Linhagem celular de origem de neoplasia de cérvix uterina escamosa humana, com propriedade aderente, morfologia semelhante à célula epitelial. Tumorigênica em camundongos nude, formando carcinoma epidermal pouco diferenciado (grau III). Contém uma cópia genoma do papillomavírus humano do tipo 16. Genes p53 e pRB sem mutações (ATCC; Scheffer et al, 1991).
- CaSki: Linhagem celular de origem de neoplasia de cérvix uterino humano metastática, com propriedade aderente, morfologia semelhante à célula epitelial. Contém aproximadamente 500 cópias do genoma do papillomavírus humano do tipo 16. Genes p53 e pRB sem mutações (ATCC; Scheffer et al, 1991).
- C33A: Linhagem celular de origem de neoplasia de cérvix uterino humano metastática, com propriedade aderente, morfologia semelhante à célula epitelial. Tumorigênica em camundongos nude, formando carcinomas indiferenciados. Negativa para DNA e RNA do papillomavírus humano (HPV). Genes p53 e pRB com mutações (ATCC; Scheffer et al, 1991).

4.2) Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas a 37°C em frascos plásticos descartáveis contendo meio de crescimento DME suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25 µg/ml de ampicillina e 100µg/ml de estreptomicina, em atmosfera úmida de 5% CO₂. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiram 80% da densidade de saturação utilizando tripsina a 0,1% em PBSA (tampão fosfato livre de Cálcio e Magnésio) contendo 1mM EDTA, tendo sido a cultura previamente lavada com solução de PBSA. Os estoques celulares são mantidos no meio de

cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190°C , em reservatório contendo nitrogênio líquido.

4.3) Preparo dos substratos de Matriz Extracelular

O colágeno foi obtido na forma de gel hidratado e estéril, proveniente de extração de colágeno tipo I de tendão de cauda de ratos Wistar, segundo Maria & Wada, 1996. Foram extraídos 1,5 g de tendão de caudas de ratos Wistar. As fibras foram então lavadas com álcool 70% e, após a assepsia foram adicionados 100ml de ácido acético 0,5M por 48 horas a 4°C . Após esse período centrifugou-se a solução obtida por 3 horas a 2000g. O sobrenadante foi então recolhido e misturado com igual volume de NaCl 20%. A fase aquosa foi drenada e o precipitado foi centrifugado por 3 horas a 2000g. O precipitado é redissolvido em 100ml de ácido acético 0,5M e dialisado por 2 dias, com duas trocas diárias de água contra 10x o volume de gel. O gel obtido foi então liofilizado. Para o uso, pesou-se o gel liofilizado, o qual foi redissolvido em ácido acético 0,02N para a concentração desejada (2 mg/ml).

O substrato de MATRIGEL[®] é uma mistura de diferentes elementos de MEC, sendo uma preparação de membrana basal extraída de sarcoma de rato. É composto de laminina em sua maioria, seguido de colágeno tipo IV, proteoglicanos, entactina, nidogênio, TGF-alfa, ativador plasminogênico tecidual entre outros fatores de crescimento. A aquisição foi feita junto à empresa Cultrex, MA, USA e também doado pelo Dr. Matthew Hoffaman NIH/NIDC - USA. Este foi diluído em meio DME livre de soro na proporção 1:1, o que resultou na concentração de uso de 5 mg/ml.

4.4) Curvas de crescimento

Para a realização deste ensaio foram plaqueadas, em placas 24 poços descartáveis, 10^4 células das linhagens celulares analisadas/por poço, em plástico, gel de colágeno tipo I e Matrigel. As células foram mantidas em meio de crescimento DME de acordo com o item 4.2.

As células foram coletadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 de cultivo, através de tripsinização. Colagenase (1mg/ml, tipo 1A, Sigma) associada à ação da tripsina foram utilizadas para células cultivadas em colágeno e solução de Versene (solução de PBSA + 5mM de EDTA) associada a tripsina para as células cultivadas em Matrigel. Após a coleta, as células foram fixadas em solução 3,7% formaldeído-PBSA e contadas em câmara de Neubauer. Com esses dados feitas curvas de crescimento e calculados os tempos de dobramento, utilizando o programa Microsoft Excell.

O material foi documentado utilizando o microscópio Nikon, aumento 200x, com ajuda do programa Image Pro Plus 4.1.

4.5) Ensaio de Invasão em colágeno

Para análise de microscopia óptica, 10^5 células de cada linhagem foram plaqueadas em placas 24 poços na presença de gel de colágeno tipo I (2 mg/ml). As células foram cultivadas por 5 dias. A fixação utilizou solução Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0.1M, pH 7.2, contendo 5% paraformaldeído e 2.5% glutaraldeído) e as amostras enviadas para o Laboratório de Microscopia e Microanálises do Professor Sebastião R. Taboga do Departamento de Biologia do IBILCE- UNESP, em São José do Rio Preto para processamento dos cortes e aquisição de imagens.

As amostras fixadas foram desidratadas em uma série de diluições de etanol e embebidas e fixadas em parafina (Histosec, Merck). Cortes de 3 μ m de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (Behmer et al, 1976) para estudos morfológicos. Secções de cada amostra foram observadas e fotografadas utilizando o microscópio de luz Olympus BX-60, com auxílio da câmera CCD-IRIS (Sony) e software Image Pro Plus (Media Cybernetics).

4.6) Extração de RNA total

As três linhagens celulares foram plaqueadas na densidade de 10^6 células/placa 100 mm, nos três substratos estudados. As coletas foram realizadas após 5 dias de cultivo. Para a coleta removeu-se o meio, lavou-se as células por 3 vezes com PBSA. Após a lavagem, adicionou-se 1 mL de solução de lise (isotiocianato de guanidina 4M + citrato de sódio 25mM + 7 μ L de β mercaptoetanol 0.1M) sobre a camada de células e, com auxílio de uma espátula raspou-se toda a camada celular; transferiu-se o lisado para um tubo devidamente rotulado e este lisado foi imediatamente armazenado em freezer -80 °C. A purificação do RNA foi feita por ultracentrifugação com cloreto de cério (Chirgwin et al, 1979) em ultracentrífuga Beckman L8-80M rotor SW50.1, a 37000 rpm. Acrescentou-se 1,5 mL de CsCl₂ por tubo da ultracentrífuga e adicionou-se lentamente sobre a solução de CsCl₂ o lisado, deixando escorrer pela parede do tubo. A centrifugação foi feita por 16-18 horas. Após a centrifugação, removeu-se o líquido sobrenadante com pipeta Pasteur e emborcaram-se os tubos sobre papel toalha. Após o procedimento padrão, adicionaram-se 30 μ L de água milli-Q autoclavada por tubo para ressuspender o RNA. Os tubos foram agitados e aquecidos a 65°C por 10 minutos e colocados no gelo. A quantificação dos RNAs foi realizada em espectrofotômetro (Beckman DU640) sendo feitas leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após a quantificação espectrofotométrica, a qualidade dos RNAs pode ser verificada em gel de agarose-formaldeído.

Foram considerados de boa qualidade os RNAs que apresentaram uma razão da absorbância 260/280nm com valores próximos de 2. Nos géis de agarose-formaldeído pode-se confirmar a quantificação do espectrofotômetro e a relação das bandas referentes às frações 18S e 28S do RNA. A banda correspondente à fração 28S idealmente deve apresentar o dobro da intensidade da banda correspondente à fração 18S, uma vez que a molécula correspondente à fração 28S é maior e incorpora uma quantidade maior de brometo de etídio. Com os RNAs obtidos foram realizados ensaios de real time PCR. Armazenamos o RNA a -80°C.

4.7) *Real-time PCR*

4.7.1) Preparação dos cDNAs

O primeiro passo consistiu em tratar os RNAs extraídos com DNase I (Invitrogen) para eliminar contaminação por DNA genômico. Em seguida realizou-se uma transcrição reversa utilizando oligo-DT (500µg/µL, Amersham) juntamente com *random primers* (100ng/µL, Amersham). A enzima utilizada foi a SuperScript II (Invitrogen 200U/µL), além de RNase OUT (Invitrogen) para evitar a degradação do RNA *template*. Ao final da transcrição reversa foi adicionada RNase H (USB, 5 U/µL). Adicionamos 40µL de TE por tubo de reação, tendo assim cDNAs numa diluição 1:3. Os cDNAs foram armazenados em freezer -20°C.

4.7.2) Teste da eficiência da transcrição reversa

Para testar a qualidade do cDNA, foram feitas reações de PCR para três genes diferentes: GAPDH – gene expresso constitutivamente: esperávamos ver o cDNA amplificado em todas as amostras; MLH1- *primers* localizado em uma região intrônica: onde não esperávamos ver amplificação em nenhuma das amostras e se ocorresse amplificação seria sinal de que a mostra estaria contaminada com DNA genômico; NOTCH-1- gene muito longo: como a transcrição reversa se inicia na cauda poli-A do mRNA, na extremidade 3', pode ser que a transcriptase reversa não alcance a extremidade 5' da molécula, o que é um problema para genes muito longos. Os *primers* utilizados para NOTCH1 reconhecem a extremidade 5', o que quer dizer que se houver amplificação neste caso, o cDNA foi transcrito até o final e tem boa qualidade.

Mix para reação de PCR (volumes para uma reação): 6,7µl água MiliQ estéril + 1µl Tampão com NH₄10X (Fermentas) + 0,6µl MgCl₂ 25mM + 0,2µl dNTP 10 mM + 0,2µl *Primer* F + 0,2µl *Primer* R + 0,1µl Taq Polimerase Fermentas 5U/µl + 1µl *Template* (cDNA diluído 1:60). Em primeiro lugar preparamos um mix com tudo menos os *primers*. Dividimos em três

partes e adicionamos os *primers*. A partir daí colocamos 9µl por poço da placa de PCR e por último o *template*.

4.7.3) Reação de *Real Time PCR*

Para a reação de real time PCR dilui-se novamente os cDNAs obtidos, para uma diluição final 1:180. As reações foram feitas no volume final de 12µL, contendo 3 µL da mistura de um dos pares de *primers Forward* e *Reverse* de cada gene, 3 µL de cDNA proveniente do RT-PCR na diluição 1:180 e 6 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

Foram utilizados *primers* dos genes de interesse, *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *RECK* e *TIMP-2* e como controles internos os *primers* dos genes *GAPDH* e *Tubulina*. Os *primers* para *MMP-2*, *MT1-MMP*, *TIMP-2* (Figueira et al, manuscrito em preparação), *RECK*, *GAPDH* e *Tubulina* foram gentilmente cedidos pela Dra. Mari Cleide Sogayar (IQ-USP). As seqüências dos *primers* utilizados são:

h-RECK

F: 5' TGCAAGCAGGCATCTTCAAA 3'

R: 5' ACCGAGCCCATTTCATTTCTG 3'

h-MMP-9

F: 5' GAGGTGGACCGGATGTTCC3'

R: 5' AACTCACGCGCCAGTAGAAG3'

h-GAPDH

F: 5' ACCCACTCCTCCACCTTTGA 3'

R: 5' CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT 3'

h-TUBULINA

F: 5' TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG 3'

R: 5' AGTGCCAGTGCGAACTTCATC 3'

Todos os *primers* foram desenhados em diferentes éxons, para se evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico utilizando o programa Primer3 (2004). A especificidade de cada *primer* foi verificada através do BLAT (2005). Os *primers* para RECK, MMP-9, GAPDH e Tubulina foram sintetizados pela IDT Inc, (Coralville, IA, USA), e os *primers* para MMP-2, MT1-MMP TIMP-2 foram sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

O ensaio de *Real-time PCR* foi realizado no aparelho Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE - Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 1 minuto. Cada amostra foi feita em triplicata biológica, usando duplicata de poços. Como controle negativo para a reação de real-time PCR foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os primers, na ausência do template (cDNA). A análise das curvas de melting e de dissociação foi feita ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica. O threshold (cycle threshold -Ct) de cada corrida foi padronizado como 0.1, ponto no qual a amplificação observada estava na fase logarítmica.

Para análise da expressão gênica através de *Real-time PCR* foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta C_t$) (Livak & Schmittgen, 2001). Calculou-se inicialmente o ΔC_t de cada amostra, subtraindo-se os valores de C_t (threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle (GAPDH ou Tubulina) dos valores de C_t do gene alvo. Após determinação do ΔC_t da amostra, escolheu-se como amostra normalizadora o cDNA de C33A (HPV negativa) cultivada na ausência de substrato. Para o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ utilizou-se a fórmula seguinte: [ΔC_t (amostra) – ΔC_t (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_t$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Para utilizarmos o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$, foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno. Para tanto foram feitas curvas de diluições seriadas dos pools de cDNAs para cada um dos genes estudados,

partindo dos cDNAs diluídos na proporção 1:3 v/v. Para comparar a eficiência de amplificação dos dois genes, subtraem-se os valores de C_T do gene controle dos valores de C_T do gene alvo. A diferença é plotada contra o logaritmo da diluição de cDNA. Quando a inclinação da reta (*slope*), for menor ou igual que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se assim utilizar este método.

4.8) Zimografia

O ensaio de zimografia foi padronizado de acordo com Oh et al, 2001 e Kato et al, 2002. O ensaio de zimografia é uma técnica que usa a eletroforese a fim de identificar a atividade proteolítica indireta de gelatinases (MMP-2 e MMP-9), suas isoformas e seus pesos moleculares. A zimografia visa avaliar qualitativa e quantitativamente as proteases presentes em amostras de tumores e em cultura de células com meio condicionado (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994). Uma vez padronizado o ensaio, seguiu-se o experimento planejado utilizando-se as células cultivadas em plástico, colágeno e Matrigel.

4.8.1) Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura

Para o ensaio de zimografia, as linhagens SiHa, CaSki e C33A, foram plaqueadas em placas 24 poços estéreis e descartáveis com gel de colágeno tipo-I, sem substrato e em Matrigel. O número de células foi determinado de acordo com as curvas de crescimento e ensaios de diluição, para que em 24 horas após o plaqueamento houvesse 80% de confluência.

Após 24 horas de crescimento, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas 3X com DME sem soro para remoção do resíduo de soro, e submetidas ao carenciamento com DME + 0,1% BSA (bovine serum albumin – Sigma Factor V) por 72 horas, em condições ideais de cultura. Após o carenciamento e verificação da viabilidade celular, o meio de cultura foi retirado e centrifugado 2 x 800 rpm por 5 minutos a 4°C para não degradar as proteínas.

Quantificamos as proteínas do meio de cultura através do método colorimétrico de Lowry (Lowry et al, 1951).

4.8.2) Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina

Para separação das proteínas, foram feitos géis de SDS-PAGE com 10% de acrilamida e 1mg /mL de gelatina. Colocamos 25µg de proteína total de cada amostra por poço e 10µl de padrão de corrida (BIO-RAD 113-20MW) em cada gel. Corremos o gel a 50V 20mA TA (temperatura ambiente), para compactar as proteínas, e em seguida a 100V 70mA TA por 80 minutos.

4.8.3) Incubação e revelação do gel

Após corrida o gel foi lavado 2X com 2,5%Triton X-100, 15 minutos cada lavagem (TA) para retirar o SDS e renaturar as proteínas. Depois lavamos o gel 2X 1 minuto com Tampão de Incubação (0,05M TrisHCl pH 8/ 5mM CaCl₂/ 5µM ZnCl₂) TA. Em seguida incubamos o gel com este mesmo tampão por 17 horas a 37°C em banho-maria em recipiente fechado. A atividade das metaloproteinases depende dos íons Ca⁺² e Zn⁺², mas a molaridade desses íons não pode exceder o indicado acima, o que poderia levar a inibição dessas proteínas (Ambili & Sudhakaran et al, 1999).

O gel foi corado então com 0,5% Coomassie brilliant blue R-250 por 30 minutos TA, agitando-se a cuba e descorado com solução 10% metanol/ 10% ácido acético glacial. O gel foi digitalizado (450 d.p.i.) no Densitômetro de Calibração GS-700 BIO-RAD (Bloco 14 FCF) e as intensidades das bandas e pesos moleculares foram calculados utilizando o programa Molecular Analyzer (versão 1.4)

Os géis obtidos foram submetidos à análise densitométrica, transformando-os em uma imagem em preto e branco. O programa utilizado determina a atividade das gelatinases pela diferença entre a banda que apresenta a cor branca local de digestão das proteinases e o gel de coloração preta, considerado como fundo. Assim, a atividade das gelatinases é determinada

pela quantificação da digestão da banda, sendo que o maior valor negativo é atribuído à banda de maior digestão, portanto maior atividade.

Como controle da atividade das metaloproteinases, géis foram incubados com EDTA 0.5mM e Ilomastat, um inibidor sintético de MMPs (GM6001, Chemicon, Temecula, CA) 0.5mM. Como controle o tamanho das bandas de MMPs foi realizado um ensaio com MMP-2 e -9 recombinantes (Chemicon- Gelatinase zymography standards for human MMP-2 and human MMP-9). O ensaio de zimografia foi feito em quadruplicata biológica.

4.9) Análise estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão relativo. Para análise dos dados das curvas de crescimento e zimografia foi aplicado o teste de variância One-Way Anova seguido do teste de múltiplas comparações (Teste de Tukey) utilizando o programa GraphPad InStat software (versão 3.01 para Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Para análise de expressão gênica relativa foi aplicado o Teste-t em cada par de condições. Os resultados dos p-values foram demonstrados com ($P=x$) utilizando o programa R software (versão 2.2.1 para Windows, R-project.). A significância estatística de ambos os testes foi considerada como $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ e $P^{***} < 0.001$.

5) Resultados

5.1) Caracterização das linhagens SiHa, CaSki e C33A

Para verificarmos a influência do substrato no crescimento celular e na morfologia das linhagens celulares SiHa, CaSki e C33A, curvas de crescimento foram desenvolvidas para os três diferentes substratos, gel de colágeno tipo I, Matrigel e plástico, utilizado como controle (Fig. 2). Os resultados mostraram que: a) a linhagem C33A apresentou a maior taxa de proliferação, seguida por CaSki e SiHa; b) para 7 dias de cultura, as três linhagens apresentaram um menor padrão de crescimento quando cultivadas em gel de colágeno tipo-I ou Matrigel em comparação ao plástico. A linhagem CaSki apresentou uma diferença significativa de crescimento entre plástico e os substratos de MEC ($P<0.05$). As linhagens SiHa e C33A apresentaram diferenças apenas entre o plástico e o substrato de colágeno ($P<0.05$). Além disso, para as três linhagens não foram observadas diferenças estatísticas no crescimento celular entre os diferentes substratos de MEC (colágeno e Matrigel). Aos 5 dias de crescimento não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os substratos. Os tempos de dobramento de cada linhagem estão no Apêndice A.

Considerando o aspecto morfológico, entre as três linhagens estudadas, ambos os substratos de matriz, colágeno tipo I e Matrigel (Fig.3 D-F, G-I) respectivamente, induziram alterações nas células quando comparado com o plástico (Fig.3A-C), apresentando uma morfologia poligonal do tipo epitelial, semelhante à morfologia das células epiteliais.

A microscopia óptica revelou que aos 5 dias de cultivo SiHa, CaSki e C33A, não foram capazes de invadir o gel de colágeno, permanecendo na superfície do substrato, onde apenas uma única camada celular pôde ser observada (Fig. 4).

Figura 2: Perfil do crescimento das linhagens celulares de carcinoma cervical cultivadas em diferentes substratos. Notar o maior crescimento da linhagem C33A em relação à SiHa e CaSki. Cada ensaio foi feito em triplicata. A barra de erro representa o desvio padrão das medidas obtidas. * $P < 0.05$.

Figura 3: Aspectos morfológicos das células SiHa, CaSki e C33A cultivadas por 5 dias, observadas em microscopia de contraste de fase, cultivadas em diferentes substratos. (P) plástico, (C) colágeno e (M) Matrigel. Notar que as células apresentam morfologia modificada na presença de substrato de matriz extracelular. Aumento de 200X.

Figura 4: Ensaio de Invasão em colágeno: Microscopia óptica das células cultivadas em colágeno tipo I por 5 dias coradas com HE. Cortes semi-finos (3µm de espessura). Células SiHa (A1, 2, 3) CaSki (B1, 2, 3) e C33A (C1, 2 e 3) apresentam-se aderidas ao substrato colagênico e formando monocamadas, sem característica de invasão. Aumento de 100X.

5.2) Expressão gênica de *RECK*, *TIMP-2*, *MMP-2*, *-9* e *MT1-MMP* em linhagens celulares de carcinoma cervical.

A fim de avaliar os níveis de mRNA de alguns componentes do degradoma, as linhagens celulares SiHa, CaSki e C33A foram cultivadas em plástico, gel de colágeno tipo I e Matrigel. Para os ensaios de *Real-time PCR* foram utilizados dois genes como controle interno, GAPDH e Tubulina. Os resultados gerados utilizando-se esses dois controles apresentaram o mesmo perfil, porém passamos a apresentar os dados normalizados com GAPDH. Os resultados da expressão gênica relativa de *RECK*, *MMP-2*, *-9*, *MT1-MMP* e *TIMP-2* estão apresentados nas figuras 5-9. A análise estatística dos dados de real-time PCR encontra-se no Apêndice B. Os valores de expressão gênica estão representados no Apêndice C. As curvas de dissociação e a validação do método Delta-Delta Ct de cada gene estão apresentadas respectivamente nos Apêndices D e E.

Quando comparamos as diferentes linhagens cultivadas em um mesmo substrato, observamos que a linhagem CaSki (HPV 16 positiva) apresentou uma maior expressão de *RECK* quando comparada às linhagens SiHa (HPV16 positiva) e C33A (HPV negativa), na ausência de substrato (plástico) ($P < 0.001$). Para o substrato de colágeno, a expressão de *RECK* foi significativamente maior em CaSki do que em C33A ($P < 0.01$). No substrato de Matrigel, CaSki apresentou maior expressão de *RECK* significativamente diferente de SiHa ($P < 0.01$) e de C33A ($P < 0.05$). Considerando a linhagem C33A separadamente, o substrato de Matrigel apresentou uma maior expressão de *RECK* ($P < 0.05$) em relação ao plástico (Fig.5).

As linhagens HPV positivas, CaSki e SiHa, apresentaram uma maior expressão de *MMP-2* comparada à linhagem HPV negativa C33A, quando cultivadas em plástico ($P < 0.001$) e em Matrigel ($P < 0.01$). No substrato de colágeno, CaSki apresentou maior expressão de *MMP-2* em relação à C33A ($P < 0.01$). Considerando cada linhagem separadamente, SiHa e CaSki apresentaram uma maior expressão de *MMP-2* em Matrigel ($P < 0.05$) e C33A no

substrato de colágeno ($P < 0.01$). Além disso, podemos observar um perfil semelhante na expressão gênica de *MMP-2* em relação aos substratos (Matrigel > colágeno > plástico) para todas as linhagens estudadas. Ao avaliarmos a expressão gênica de *MMP-9*, observamos que raros transcritos foram detectados. Devido a este fato, a expressão de *MMP-9* não apresenta diferenças estatísticas entre as linhagens HPV positiva e negativa e entre os substratos de cultivo ($P > 0.05$) (Fig. 6-7).

MT1-MMP, a qual está envolvida no complexo de ativação de *MMP-2* juntamente com *TIMP-2*, também apresentou uma maior expressão em linhagens HPV positivas em comparação à linhagem HPV negativa ($P < 0.001$). Entretanto, quando comparamos os diferentes substratos para uma mesma linhagem, a expressão de *MT1-MMP* não apresentou alterações significantes ($P > 0.05$), apesar dos dados mostrarem perfis semelhantes de aumento de expressão para SiHa e CaSki quando cultivadas no substrato de colágeno.

Em relação à expressão de *TIMP-2*, a linhagem HPV positiva SiHa apresentou maior expressão do que a linhagem HPV negativa C33A ($P < 0.001$). CaSki apresenta maior expressão de *TIMP-2* do que C33A somente quando cultivada em plástico ($P < 0.001$). Assim como para *MT-1-MMP*, quando analisamos as linhagens separadamente, os substratos de matriz não influenciaram a expressão de *TIMP-2* ($P > 0.05$).

Os resultados, em conjunto, revelam que para os genes analisados, *MMP-2*, *MT1-MMP* e *TIMP-2*, as linhagens HPV positivas (SiHa e CaSki) apresentam maior expressão gênica do que a linhagem HPV negativa (C33A). O gene *RECK* apresentou um padrão de expressão diferente dos outros genes, pois somente na linhagem CaSki observamos um aumento de sua expressão, com níveis muito baixos nas demais linhagens observadas. *MMP-9* apresentou níveis muito baixos de expressão gênica.

Figura 5: Expressão gênica de *RECK* normalizada por *GAPDH*. CaSki apresentou uma maior expressão de *RECK* quando comparada com a linhagem SiHa e C33A tanto para o plástico ($P < 0.001$) quanto para Matrigel ($P \leq 0.05$). No substrato de colágeno CaSki apresentou maior expressão de *RECK* em relação à C33A. Considerando cada linhagem separadamente, o substrato de Matrigel aumentou a expressão de *RECK* para C33A em relação ao plástico. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figura 6: Expressão gênica de *MMP-2* normalizada por *GAPDH*. As linhagens HPV positivas (SiHa e CaSki) apresentaram maior expressão de *MMP-2* que a linhagem HPV negativa (C33A) quando cultivadas em plástico ($P < 0.001$) e Matrigel ($P < 0.01$). Quando as linhagens são analisadas separadamente, observamos um aumento da expressão de *MMP-2* para CaSki e SiHa no substrato de Matrigel ($P < 0.05$) e para C33A no substrato de colágeno ($P < 0.01$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figura 7: Expressão gênica de *MMP-9* normalizada por *GAPDH*. Notar o baixo nível de expressão gênica de *MMP-9* em todas as linhagens. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as linhagens HPV positivas (SiHa e CaSki) e a linhagem HPV negativa (C33A) em nenhum dos substratos.

Figura 8: Expressão gênica de *MT1-MMP* normalizada por *GAPDH*. Para os três substratos, as linhagens HPV positivas (SiHa e CaSki) apresentaram maior expressão de *MT1-MMP* que a linhagem HPV negativa (C33A) ($P < 0.001$). Quando analisamos cada linhagem separadamente, o substrato de matriz não influenciou a expressão gênica. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

Figura 9: Expressão gênica de *TIMP-2* normalizada por *GAPDH*. Para os três substratos, a linhagem SiHa (HPV positiva) apresentaram maior expressão que a linhagem C33A (HPV negativa) ($P < 0.001$). Quando analisamos cada linhagem separadamente, o substrato de matriz não influenciou a expressão gênica. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

5.3) Atividade de MMP-2 e MMP-9

Após análise da expressão gênica, nós prosseguimos à análise da atividade das MMP-2 e MMP-9. Para isso, as linhagens SiHa, CaSki e C33A foram cultivadas em gel de colágeno tipo-I, Matrigel e plástico. A figura 10 (A) mostra o gel de zimografia das linhagens SiHa, CaSki e C33A cultivadas nos três diferentes substratos. A forma pró-ativa de MMP-9 (PM 92 kDa) apresentou-se como uma banda fraca em todas as linhagens estudadas no plástico e no Matrigel, mas intensificada na presença do substrato de colágeno. Em contraste com a atividade de pró-MMP-9, a forma pró-ativa de MMP-2 (PM 68 kDa) apareceu no gel como bandas claras e definidas em todas as linhagens e substratos estudados. Assim como pró-MMP-9, o substrato de colágeno induziu a atividade de pró-MMP-2, representada por bandas intensas e maiores. A atividade das MMPs foi confirmada utilizando-se inibidores de MMPs como EDTA (Fig. 10 B) e Ilomastat (dado não apresentado) no tampão de incubação. O EDTA (agente quelante) impede que o Zn^{+2} e o Ca^{+2} necessários para ativação das MMPs, ativem estas enzimas. O zimograma utilizando as MMPs -2 e -9 recombinantes (Fig 10 C) confirma o padrão de peso molecular das pró-MMPs.

Na figura 11, observam-se as quantificações das atividades de pró-MMP-2 e pró-MMP-9. A atividade de pró-MMP-2 em SiHa no colágeno é aproximadamente 1.8 vezes maior que no plástico e no Matrigel ($P < 0.05$). Para CaSki e C33A, essa atividade é aproximadamente 1.7 e 13.5 vezes maior no colágeno que no plástico (Fig. 11 A). Os nossos dados mostram que a atividade de pró-MMP-2 no plástico é maior nas linhagens HPV positivas do que na linhagem HPV negativa ($P < 0.01$). A atividade de pró-MMP-9 é menor do que a de pró-MMP-2 para as três linhagens estudadas, sendo que o substrato de colágeno para a linhagem CaSki aparece como indutor da atividade de pró-MMP-9 ($P < 0.05$) (Fig.11 B). Assim como os dados de expressão gênica, não foram observadas diferenças estatísticas para a atividade de pró-MMP-9 entre as linhagens HPV positiva e negativa ($P > 0.05$). A análise estatística dos dados de zimografia apresenta-se no Apêndice B.

Figura 10: Gel 10% acrilamida e 1% de gelatina para zimografia. Células carenciadas por 72 horas, utilizando-se 25 μ g de proteína/poço. P – plástico, C - colágeno tipo I e M - Matrigel. Em (A) observamos a atividade de pró-MMP-2 e -9 nas linhagens SiHa, CaSki e C33A, quando cultivadas em diferentes substratos. Notar que a atividade das MMPs evidenciadas pelas bandas claras. Em (B), gel de zimografia utilizando o inibidor de MMPs EDTA. Notar a ausência de bandas nos gel tratado com EDTA confirmando a ação enzimática de metaloproteinases da figura A. Em (C) gel utilizando o padrão de peso molecular com MMPs -2 e -9 recombinantes, confirmando o peso molecular das pró-MMPs -2 e -9. Para B e C foram utilizados o substrato de colágeno e o plástico como controle.

Figura 11: Quantificação das atividades das MMPs. Em pró-MMP-2 (**A**) observamos para o plástico, que as linhagens HPV positivas (SiHa e CaSki) apresentaram maior atividade do que a linhagem HPV negativa (C33A) ($P < 0.01$). Notar que para todas as linhagens o substrato de colágeno tipo I induziu a atividade de MMP-2 ($P < 0.05$). Em pró-MMP-9 (**B**), observamos que não há diferenças estatísticas entre as linhagens HPV positivas e negativa. Para a linhagem CaSki, o substrato de colágeno induziu a atividade de pró-MMP-9 ($P < 0.05$). A atividade da pró-MMP-2 é maior que a de pró-MMP-9 em todas as linhagens em todos os substratos. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

6) Discussão

Estudos recentes têm demonstrado que níveis elevados de expressão e atividade de MMP-2, MMP-9 e de expressão de MT1-MMP estão associados à progressão e invasão dos carcinomas escamosos de cérvix uterina (Sheu et al, 2003; Gaiotto et al, 2004, Asha et al, 2003; Brummer et al, 2002; Zhai et al 2005, Gilles et al., 1996). Entretanto, pouco se sabe a respeito da capacidade de invasão, expressão e produção de MMPs, bem como de seus inibidores em tumores cervicais (Smola-Hess, 2005). Além disso, não há dados na literatura a respeito de uma correlação direta dos índices aumentados de MMPs e a presença do vírus HPV.

Nós avaliamos alguns componentes do degradoma, o qual é formado por um conjunto de proteinases expressas por uma célula, tecidos ou organismos, que atuam na progressão tumoral (Overall & Lopes-Otín, 2002), tais como MMP-2, -9 e MT1-MMP, e seus inibidores TIMP-2 e RECK, sendo que este último nunca foi relatado em tumores cervicais.

Nossos dados demonstram que a linhagem HPV negativa C33A tem uma taxa de proliferação maior do que as linhagens HPV positivas CaSki e SiHa. A capacidade de E6 e E7 fazer com que as células infectadas não controlem mais os checkpoints de seu ciclo celular é importante para que ocorra a imortalização de queratinócitos primários, além disso, a expressão desses oncogenes é necessária para que ocorra a manutenção da proliferação. Apesar da linhagem C33A não expressar os oncogenes E6 e E7, ela possui uma alta taxa de proliferação, provavelmente devido ao acúmulo de mutações nos genes que controlam o ciclo celular, como p53 e pRB (Scheffer et al, 1991).

O retardo de crescimento celular em substrato de matriz extracelular, seja em colágeno ou em membrana basal reconstituída (Matrigel), é relatado como resultado da indução de diferenciação celular nestes substratos, uma vez que as células primeiramente necessitam reconhecê-lo, adiando a divisão e privilegiando a migração sobre o substrato. Assim, de acordo

com Cocoran & Del Maestro, 2003, os fenômenos de divisão e migração celulares são eventos temporalmente exclusivos.

Para vários autores a diferença que existe entre invasão e migração reside nas barreiras que a célula precisa transpor para ir de um local a outro, portanto, a invasão é definida como a migração através de uma matriz obstrutiva. Para vertebrados, um ensaio clássico para avaliar a capacidade de invasão do estroma por células tumorais consiste em analisar o número de células dentro de géis de colágeno, que foram cultivadas em sua superfície (Mareel & Leroy, 2003). O Matrigel, comparado aos géis de colágeno, apresenta uma menor densidade e uma integridade mecânica mais frouxa, o que facilita a invasão celular (Sieuwerts et al. 1997; Demou & McIntire, 2002). O gel de colágeno 3D que possui ligações cruzadas evita a migração dependente de proteólise em relação ao gel de colágeno não possui estas ligações (Even-Ram & Yamada, 2005).

Estas células quando cultivadas em substratos de colágeno e Matrigel, assemelham-se morfológicamente às células da porção do epitélio escamoso. Tal alteração morfológica, entretanto, não representa o processo invasivo em substrato de colágeno no tempo observado de 5 dias de cultura. Kato (2002) descreve o processo invasivo de várias linhagens de carcinoma cervical, entre elas, SiHa, CaSki e C33A em 3 dias de cultivo em ensaios de “transwell” cuja superfície foi recoberta com Matrigel. Os ensaios de invasão de Kato et al, 2002 mostram que CaSki e SiHa apresentam altas taxas de invasão enquanto C33A apresenta uma taxa menor, embora também migre através do “transwell”. A capacidade invasiva destas linhagens foi correlacionada positivamente com a expressão e secreção MMP-2, mas não com MMP-9.

Sendo assim, baseados nestes dados de Kato (2002), aos 5 dias de cultivo as células já migraram para o interior do Matrigel ou ainda estão na superfície do gel de colágeno. Em função de responder se os diferentes substratos têm influência na expressão das enzimas envolvidas no processo invasor, nós passamos à análise quantitativa da expressão gênica através de real-time PCR.

Os dados apresentados aqui mostram que há maior nível de expressão de MMP-2 nas linhagens HPV positivas do que na linhagem HPV negativa. A literatura relata que tumores cervicais humanos apresentam ativação e expressão de MMP-2 gradualmente aumentadas durante progressão tumoral e estão relacionadas com pior prognóstico do paciente (Brummer et al, 2002; Sheu et al, 2003; Gaiotto et al, 2004). Iwasaki e colaboradores (2002) demonstraram que a expressão de MMP-2 é semelhante para SiHa e CaSki, dados de Northern blot que estão de acordo com nossos dados de real-time PCR.

Sabe-se que *in vivo*, carcinomas microinvasores e *in situ* apresentam níveis menores de MMP-2 do que aqueles apresentados por células que estão em estágios de invasão microvascular e metastático (Nuovo et al, 1997). Assim, era esperado que houvesse uma modulação da atividade desta MMP nos substratos de MEC, uma vez que este tempo de cultivo representaria os processos iniciais de invasão *in vivo*, simulado *in vitro*, com o crescimento em Matrigel como indicado pela literatura (Kato et al, 2002); e que colágeno, simularia o crescimento e invasão em estroma tumoral. Nossos dados mostram que mesmo as células não invadindo o gel de colágeno, há uma maior expressão de *MMP-2* quando essas linhagens são cultivadas em substratos de matriz extracelular.

A análise de expressão de MT1-MMP nos mostra um perfil semelhante ao de MMP-2, onde as linhagens HPV positivas, SiHa e CaSki, apresentam a expressão maior deste gene comparativamente com C33A, a linhagem HPV negativa.

Smola-Hess et al, 2005, descrevem que MT1-MMP é constitutivamente expressa em várias células HPV positivas (SiHa e CaSki (HPV 16), C4-1, SW756, Hela (HPV18) e queratinócitos HPV 16 ou 18) e que, queratinócitos normais transformados com E7 de HPV de alto risco (16 e 8) também expressam altos níveis de MT1-MMP, sugerindo que o vírus deva contribuir para a sua expressão. A alta expressão de MT1-MMP foi também relatada por Sheu et al, 2003 em espécimes de câncer cervical e durante o processo invasivo *in vivo*.

Recentemente, Zhai et al., 2005 demonstraram que a expressão protéica de MT1-MMP apresenta-se maior em SiHa e CaSki, mas é indetectável em C33A.

O zimógeno de MMP-2 é constitutivamente produzido na maioria dos tipos celulares (Ries & Petrides, 1995). A ativação da pro-MMP-2 ocorre na superfície celular pela clivagem inicial realizada por MT1-MMP, em um processo regulado pela TIMP-2. O complexo ternário pro-MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP permite a ativação de MMP-2 por outra TIMP-2 livre e por uma MMP-2 ativa, que remove o pro-peptídeo clivado inicialmente (Ellerbroek & Stack, 1999; Sternlicht & Werb, 2001; Bernardo & Fridman, 2003). O inibidor tecidual de metaloproteinases TIMP-2 também apresenta maior expressão nas linhagens HPV positivas do que na linhagem HPV negativa. A formação do complexo ternário pelas MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 pode explicar os níveis elevados destes três genes nas linhagens HPV positivas, SiHa e CaSki, sugerindo que o HPV pode estar envolvido na expressão dessas MMPs. Além disso, níveis elevados de TIMP-2 observados podem representar um processo de contenção da invasão tumoral. Estudos com amostras de pacientes revelam que há uma diminuição da expressão de TIMP-2 de acordo com o aumento da malignidade do tumor, provavelmente através de metilação (Sheu et al., 2003; Ivanova et al., 2004).

Os níveis de MMP-9 para as três linhagens estudadas nos três diferentes substratos encontrados são muito baixos, não apresentando diferença estatística. Os baixos níveis de expressão de MMP-9 em tumores de colo de útero foram relatados por outros autores (Iwasaki et al, 2002; Smola Hess 2001) e confirmado neste trabalho por real-time PCR.

Tem sido descrito que o restabelecimento da expressão de RECK em linhagem HT1080 de fibrosarcoma resulta em uma diminuição da secreção tanto da forma intermediária, quanto da forma ativa de MMP-2, sugerindo que RECK regula a ativação da pró-MMP-2 por inibir duas enzimas proteolíticas necessárias para o seu processamento, especificamente as enzimas MT1-MMP e a própria MMP-2 ativa (Oh et al., 2001). Além disso, RECK também se liga a MMP-9 e inibindo sua atividade proteolítica (Takahaski et al, 1998). Níveis muito baixos de

RECK foram detectados em nossos ensaios, não mostrando correlação com o substrato de cultivo e com a presença ou não do vírus HPV.

No entanto, os resultados mostram que a linhagem CaSki apresenta níveis de *RECK* relativamente maiores ao níveis de *MMP-9*. CaSki contém aproximadamente 500 cópias do genoma de HPV 16 integradas em seu genoma celular, enquanto SiHa apresenta apenas um cópia de HPV 16 em seu genoma e C33A é negativa para o DNA do HPV (Badal et al., 2003). Apesar deste fato, o número de cópias do RNA de E6 e E7 não é considerado diferente entre CaSki e SiHa (Wang-Johanning et al., 2002), uma vez que a maioria das cópias do genoma de HPV 16 está hipermetilada em CaSki e não metilada em SiHa nas região LCR (long control region) e no oncogene E6 (Badal et al., 2003).

Seedorf et al. (1987) demonstraram que SiHa e CaSki apresentam diferentes níveis de expressão protéica do oncogenes E6, E7 e E4, isto é, CaSki apresenta maiores níveis de E6 e E7 do que SiHa. Uma vez que SiHa e CaSki são HPV16 positivas, nós hipotetizamos que os níveis das oncoproteínas de HPV podem estar aumentando a expressão de *RECK* na linhagem CaSki. Para poder analisar esta hipótese, outros modelos nos quais as oncoproteínas virais estão atuando em transcricionalmente relatam que as oncoproteínas E6 e E7 possuem efeitos evidentes na transcrição celular, através da ativação ou inibição de promotores, resultando no interrompimento da diferenciação celular e na estimulação da proliferação de queratinócitos (McHurray et al., 2001; McCance 2005a). E6 ativa o promotor de hTert, transcriptase reversa da telomerase humana, promovendo a imortalização celular (Fehrman & Laimins, 2003), por outro lado, E7 interage com fatores de transcrição da família AP-1, entre eles c-Jun, o qual potencializa a ativação de genes envolvidos na progressão inicial do ciclo celular, como a ciclina dependente de quinase (cdc25A), promovendo a entrada na fase S (McHurray et al., 2001; McCance 2005a). Desta forma, E6e/ou E7 podem estar atuando no promotor do gene *RECK*, aumentando sua transcrição em CaSki.

A literatura indica RECK como um regulador negativo, pós-transcricional, de MMPs -2, -9 e MT1-MMP (Oh et al., 2001; Noda et al., 2003). Sabendo-se que MMP-2 e -9 dependem também de eventos transcricionais e pós-traducionais, já correlacionados com a progressão metastática de tumores cervicais, nós prosseguimos à análise zimográfica de nosso modelo.

Os nossos dados de zimografia são consistentes com os dados de *real-time* PCR: as linhagens HPV positivas apresentam maior atividade de pró-MMP-2 do que a linhagem HPV negativa. Apesar da expressão de pró-MMP-9 ser muito baixa, nós demonstramos sua atividade, sugerindo que talvez poucas cópias sejam suficientes para a produção do zimógeno de MMP-9. Além disso, tanto a atividade quanto a expressão de MMP-9 parecem não estar relacionadas com a presença do vírus HPV. Kato et al. (2002) demonstraram por ensaio de zimografia que tanto SiHa quanto CaSki apresentam maior atividade de MMP-2 do que C33A e que a atividade de MMP-9 é menor do que a atividade de MMP-2 para as três linhagens, como confirmado neste trabalho por *real-time* PCR e zimografia.

Através da zimografia observamos que as atividades de pró-MMP-2, para todas as linhagens, e pró-MMP-9, para CaSki, é maior quando estas células são cultivadas em gel de colágeno tipo I. Além disso, foi observado que o gel de colágeno tipo I parece induzir a expressão gênica de MT1-MMP para SiHa e CaSki. Alguns estudos relatam que células cultivadas em altas concentrações de colágeno tipo I (750 µg/ ml) possuem maior ativação de MMP-2 (Théret et al, 1999; Takino et al, 2004) aumentando sua capacidade invasiva (Takino et al, 2004).

Takino et al. (2004) propõem uma hipótese de que o colágeno induziria a ativação de MMP-2, cultivando células da linhagem HT1080 em gel 3D de colágeno tipo I: O colágeno tipo I ativa a proteína mitogênica-quinase ERK (CA-MEK, mitogen-activated protein-ERK kinase) que ativa quinase reguladora de sinal extracelular (ERK, extracellular signal-related kinase) a qual, por sua vez, ativa MT1-MMP, que em um mecanismo de “feed-back” positivo ativa ERK. MT1-MMP então atua no complexo de ativação de MMP-2. Para que haja uma

indução sustentada de ERK e MMP-2, é necessário que as células tumorais estejam em substrato de colágeno tipo I 2D com alta concentração ou em gel 3D. Embora tenha sido observado neste trabalho que o colágeno parece induzir a expressão de MT1-MMP e a atividade de pró-MMP-2, as vias que regulam estes eventos precisam ser melhor elucidadas.

De acordo com o que foi originalmente proposto por Takahashi et al, 1998. RECK regula a atividade das MMP-2 e MMP-9. No entanto, nossos resultados mostram que a atividade das pró-MMPs -2 e -9 não parecem ser reguladas por RECK, uma vez que não há uma correlação entre aumento da expressão de *RECK* e diminuição da atividade de MMPs. Nós hipotetizamos que para o modelo de carcinoma de cérvix uterina, os inibidores de MMPs que estejam atuando mais ativamente sejam as TIMPs, no caso TIMP-2, e não RECK.

Furomoto et al, 2001, demonstraram que em hepatocarcinomas RECK e MMP-9 são expressos em níveis similares tanto na forma de mRNA quanto na forma protéica, não apresentando aparentemente correlação inversa entre esses dois genes. Uma vez que RECK e MMP-9 possuem em seus promotores sítios para ligação do fator transcricional Sp1, o qual está associado ao aumento da transcrição destes genes, foi sugerido que esses genes possuem um mecanismo de regulação de expressão gênica semelhante (Sato & Seiki, 1993, Sasahara et al, 1999, Furomoto et al, 2001).

Nossos dados contribuem para a discussão a respeito do papel do HPV na indução de atividade de pró-MMP-2 e possivelmente para pró-MMP-9, já que principalmente para pró-MMP-2 existem diferenças estatísticas demonstrando a maior atividade desta MMP em células HPV positivas, na ausência de substrato de MEC. Além disso, nossos dados de expressão gênica relacionam-se com os dados zimográficos, pois para MMP-2 é observada maior expressão do que MMP-9.

O papel do HPV como um possível regulador de MMPs e seus inibidores ainda não foi determinado. Nuovo et al. (1997) demonstraram que não há mudanças significativas no comportamento invasivo das células que expressam os transcritos de HPV E6 e E7. No entanto,

Johansson et al. (1999) observaram que a expressão de MMP-13 (colagenase-3) em CaSKi e carcinomas vulvares estavam correlacionados com a presença de HPV oncogênicos, sugerindo que o HPV pode ter um papel indutor de MMP-13.

Smola-Hess et al. 2005 demonstraram que a expressão do oncogene E7 de HPVs de alto risco (16 e 8) é capaz de aumentar a expressão de MT1-MMP em queratinócitos e células da linhagem HaCaT (células HPV negativas), sugerindo que a oncoproteína E7 possa regular a expressão dessa MMP.

Em um recente estudo, Vázquez-Ortíz et al (2005) demonstraram que em carcinomas cervicais invasivos HPV positivos, tanto amostras de tecidos quanto linhagens celulares superexpressam alguns genes, entre eles MMP-10 (cujo substratos são proteoglicanas e fibronectina), VEGF, IL6 entre outros, fazendo uma correlação positiva entre a presença do vírus HPV e a superexpressão destes genes.

Em um modelo de carcinoma nasofaríngeo, foi observado que RECK está atuando na interação câncer-vírus, pois a linhagem TW04 (carcinoma nasofaríngeo) infectada pelo Epstein-Barr vírus (EBV), possui uma maior produção de MMP-9 e apresenta um fenótipo invasivo e metastático devido ao papel da proteína viral LMP1 (latent membrane protein - proteína latente de membrana 1) ao reprimir a transcrição do sítio Sp1 do promotor de *RECK* (Liu et al., 2003a).

Em conclusão, nós demonstramos que o aumento da expressão de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 e da atividade de pró-MMP-2, estão relacionados com a presença do vírus HPV, sugerindo que o HPV está associado com a expressão MMPs e TIMP-2. Uma vez que os oncogenes E6 e E7 são necessários tanto nos estágios iniciais da infecção viral quanto nos eventos tardios que ajudam as células infectadas a se tornarem invasivas (McCance, 2005b), futuros trabalhos com os oncogenes do HPV 16 serão necessários para elucidar o papel do HPV no processo invasivo do carcinoma de cérvix uterina.

7) Referências Bibliográficas

Ambili M & Sudhakaran PR. Modulation of Neutral Matrix Metalloproteinases of Involuting Rat Mammary Gland by Different Cations and Glycosaminoglycans. **J Cell Biochem**, v.73, p.218-26, 1999.

Asha Nair S, Karunakaran D, Nair MB, Sudhakaran PR. Changes in matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during tumor progression in the uterine cervix. **J Cancer Res Clin Oncol**, Feb; v.129(2), p.123-31, 2003.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci**, v. 115(Pt 19), p.3719-27, 2002.

Badal V, Chuang LSH, Tan EHH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BFL, Bernard HU. CpG Methylation of Human Palillomavirus Type 16 DNA in Cervical Cancer Cell Lines and in Clinical Specimens: Genomic Hypomethylation Correlates with Carcinogenic Progression. **J Virol**, v.77 (11), p.6227-34, 2003.

BLAT - Human BLAT Search -Disponível em: <http://genome.ucsc.edu>. Acesso em 2004/2005.

Bhemer OA, Tolosa EMC, Neto AGF. Manual de práticas para histologia normal e patológica. **Edart-Edusp**, São Paulo, p.239, 1976.

Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.50(2), p.97-116, 1998.

Bernardo MM & Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. **Biochem. J**, v.374, p.739-745, 2003.

Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation**, v.70(9-10), p.537-46, 2002.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. **Curr Opin Cell Biol**, Dec, v.15(6), p.753-62, 2003.

Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Res. Review**, v.89(2), p.183-90, 2002.

Brummer O, Bohmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kuhnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. **Gynecol Oncol**, v. 84(2), p.222-7, 2002.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, Jan, v.16(1), p.1-17, 2003.

Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Res Review**, v. 89(2), p.191-9, 2002.

Chang C & Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **TRENDS in Cell Biology Rev**, Nov, v.11(11), p.S37-43, 2001.

Chang HC, Li LT, Hung WC. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. **Cellular Signalling**, v. 16, p.675-79, 2004.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry**, Nov 27, v.18(24), p.5294-9, 1979.

Corcoran A & Del Maestro RF. Testing the "Go or Grow" hypothesis in human medulloblastoma cell lines in two and three dimensions. **Neurosurgery**, v.53(1), p.174-84, 2003.

Corrêa TCS, Brohem CA, Winnischofer SMB, Cardeal LBS, Sasahara RM, Taboga SR, Sogayar MC, Maria-Engler SS. Downregulation of the RECK- tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. *J Cell Biochem*, 2006. *No prelo*.

Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus Type Specific DNA and RNA Persistence- Implications for Cervical Disease Progression and Monitoring. **J Med Virol**, v. 73, p.65-70, 2004.

Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Reich R. MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma--a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. **Gynecol Oncol**, Jun, v.73(3), p.372-82, 1999.

DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. **Am J Pathol**, Review. v.164(4), p.1131-9, 2004.

Demou ZN & McIntire LV. Fully automated three-dimensional tracking of cancer cells in collagen gels: determination of motility phenotypes at the cellular level. **Cancer Res**, v. 62(18), p.5301-7. 2002.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. *Classification of papillomaviruses*. **Virology**, Review. Jun 20, v.324(1), p.17-27. 2004.

Egeblad M & Werb Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. **Nature Reviews/Cancer**, v.2, p.161-74, 2002.

Ellerbroek S M. & Stack M S. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. **Bioessays**, v.21(11), p. 940-9, 1999.

Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, Albini A. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. **Clin Exp Metastasis**, v.18(2), p.111-20. Review, 2000.

Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, Review. Aug 11, v.22(33), p.5201-7, 2003.

Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev Panam Salud Publica**, v. 6(4), p.223-33, 1999.

Furumoto K., Arii S, Mori A, Furuyama H, Gorrin Rivas M J, Nakao T, Isobe N, Murata T, Takahashi C, Noda M, Imamura M. 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, v. 33(1), p.189-95, 2001.

Gaiotto MA, Focchi J, Ribalta JL, Stavale JN, Baracat EC, Lima GR, Guerreiro da Silva ID. Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. **Am J Obstet Gynecol**, May, v.190(5), p.1278-82, 2004.

Gilles C, Polette M, Piette J, Munaut C, Thompson EW, Birembaut P, Foidart JM. High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. **Int J Cancer**, v.65(2), p.209-13, 1996.

Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. **Int J Cancer**, v.67(2), p.275-82, 1996.

Heilmann V & Kreienberg R. Molecular Biology of Cervical Cancer and Its Precursors. **Curr Womens Health Rep**, Review. v.2(1), p. 27-33, 2002.

Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. **Br J Cancer**, Review. v. 89(10), p.1817-21, 2003.

Ikenberg H, Teufel G, Schmitt B, Kommoss F, Stanimirovic B, Pfleiderer A. Human papillomavirus DNA in distant metastases of cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 48(1), p.56-60, 1993.

Itoh Y. & Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochem**, v.38, p.21-36, 2002.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em 29/03/2006.

Ivanova T, Vinokurova S, Petrenko A, Eshilev E, Solovyova N, Kisseljov F, Kisseljova N. Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP-2 gene in cervical cancer. **Int J Cancer**, Mar 1, v.108(6), p.882-6, 2004.

Iwasaki M, Nishikawa A, Fujimoto T, Akutagawa N, Manase K, Endo T, Yoshida K, Maekawa R, Yoshioka T, Kudo R. Anti-invasive effect of MMI-166, a New Selective Matrix Metalloproteinase Inhibitor, in Cervical Carcinoma Cell Lines. **Gynecologic Oncology**, v 85, p.103-107, 2002.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin**, Jan-Feb; v.55(1), p.10-30, 2005. Erratum in: **CA Cancer J Clin**, Jul-Aug; v.55(4),p.259, 2005.

de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, Kenter G, Offringa R, van der Burg SH. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4⁺ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Res**, Aug 1, v.64(15), p.5449-55, 2004.

Johansson N, Vaalamo M, Grenman S, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. **Am J Pathol**, v.54(2), p.469-80, 1999.

Jordan LB Monaghan H. Pathology of the cervix: recent developments. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**,. Review. v.16(4), p.248-54., 2004.

Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. **Oncol Rep**, v. 9(3), p. 565-9. 2002.

Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. A Ras-related gene with transformation suppressor activity. **Cell**, v.56(1), p.77-84, 1989.

Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal Biochem**, v.218(2), p.325-9, 1994.

Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. **Expert Rev Mol Med**, Sep 22, v.2003, p.1-39, 2003.

La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlation of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **British Journal of Cancer**, v.90, p.1414-21, 2004.

Lin CQ.& Bissel MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **FASEB J**, v.7 (9), p.735-6, 1993.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, Dec, v.25(4), p.402-8, 2001.

Liu LT, Peng JP, Chang HC, Hung WC. RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. **Oncogene**, Nov 13, v.22(51), p.8263-70, 2003a.

Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. **Cancer Res**, Jun 15, v.63(12), p.3069-72, 2003b.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with folin-phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.265-75, 1951.

Mannello F, Tonti G, Papa S. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. **Curr Cancer Drug Targets**, Review . Jun, v.5(4), p.285-98, 2005.

Mareel M & Leroy A. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. **Physiol Rev**, v.83, p.337-76, 2003.

Maria S S. & Wada M L. Cytochemical analysis of Vero cells on type I collagen gels in long- term culture. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v.33(10), p. 748-50, 1996.

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. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. **Clin Can Res**, v. 9, p.1779-1784, 2003.

McCance DJ. Transcriptional regulation by human papillomaviruses. **Curr Opin Genet Dev**, Oct, v.15(5), p.515-9, 2005a.

McCance DJ. Human papillomaviruses and cell signaling. **Sci STKE**, Jun 14, v.2005 (288), pe29, 2005b.

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McCance DJ. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, Review. Feb, v.82(1), p.15-33, 2001.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v.348(6), p.518-27, 2003.

Mysliwiec AG. & Ornstein D L. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, v.1(4), p.208-19, 2002.

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, v.52, p.255-264, 2002.

NCBI -National Center for Biotechnology Information. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em 22/11/2005.

Noda M, Selinger Z, Scolnick EM & Bassin RH. Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80(18), p.5602-6, 1983.

Noda M, Kitayama H, Matsuzaki T, Sugimoto Y, Okayama H, Bassin R H, Ikawa Y. Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated Ras genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86(1), p.162-6, 1989.

Noda M. Mechanisms of reversion. **Faseb J**, v.7(10), p.834-40, 1993a.

Noda M. Structures and functions of the K rev-1 transformation suppressor gene and its relatives. **Biochim Biophys Acta**, v.1155(1), p.97-109, 1993b.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev**, v.22(2-3), p.167-75, 2003.

Nuovo GJ, MacConnell PB, Simsir A, Valea F, French D. Correlation of the in Situ Detection of Polymerase Chain Reaction-amplified Metalloproteinase Complementary DNAs and Theirs Inhibitors with Prognosis in Cervical Carcinoma. **Cancer Res**, v.55, p.267-75, 1995.

Nuovo GJ. In SITU Detection of PCR-Amplified Metalloproteinase cDNAs, Their Inhibitors and Human papillomavirus Transcripts in Cervical Carcinoma Cell Lines. **Int J Cancer**, v.71, p.1056-60, 1997.

Oh J, Takahashi R., Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander D B, Ide C, Horan T P, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v.107(6), p. 789-800, 2001.

Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat Rev Cancer**, Review. Sep, v.2(9), p.657-72, 2002.

Plaza J A, Ramirez , Nuovo GJ. Utility of HPV Analysis for Evaluation of Possible Metastatic Disease in Women with Cervical Cancer. **In J Gynecol Pathol**, v.23(1), p.7-12, 2003.

Primer 3. Disponível em: www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Acesso em: 2004/2005.

Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. **Crit Rev Oncol Hematol**, Review. v.49(3), p.179-86, 2004.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa, LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98 (2), p.181-184, 2003.

Rhee JS. & Coussens LM. RECKing MMP function: implications for cancer development. **Trends Cell Biol**, v.12(5), p.209-11, 2002.

Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. **Biol Chem Hoppe Seyler**, Review. Jun, v.376(6), p.345-55, 1995.

Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, Sethia KK, Ellis V, Collins AT, Maitland NJ, Ball RY, Edwards DR. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. **Br J Cancer**, Jun, v.20;92(12), p.2171-80, 2005.

Sasahara RM, Takahashi C, Noda M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v.264(3), p.668-75, 1999.

Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM, Noda M, Sogayar MC. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detect Prev**, v.26(6), p. 435-43, 2002.

Sato H & Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. **Oncogene**, v.8(2), p.395-405, 1993.

Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Jul 1, v.88(13), p.5523-7, 1991.

Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v.95(17), p.1336-43, 2003.

Seedorf K, Oltersdorf T, Krammer G, Rowekamp W. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. **EMBO J**, Jan, v.6(1), p.139-44, 1987.

Shah KV, Kesis TD, Shah F, Gupta JW, Shibata D, Jones RW. Human papillomavirus investigation of patients with cervical intraepithelial neoplasia 3, some of whom progressed to invasive cancer. **Int J Gynecol Pathol**, Apr, v.15(2), p.127-30, 1996.

Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Hsu SM. Increased Expression and Activation of Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases Is Associated with the Progression and Recurrence of Human Cervical Cancer. **Cancer Res**, v. 63, p.6537-42, 2003.

Shiomi T & Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. **Cancer and Metastasis Rev**, v.22, p.145- 52, 2003.

Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, Kubista E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. **Breast Cancer Res Treat**, v72(1), p.69-77, 2002.

Sieuwerts AM, Klijn JG, Foekens JA.. Assessment of the invasive potential of human gynecological tumor cell lines with the in vitro Boyden chamber assay: influences of the ability of cells to migrate through the filter membrane. **Clin Exp Metastasis**, v.15(1), p.53-62, 1997.

Solomon D & Nayar R. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes**. 2° edition, 2004.

Smola-Hess S, Schnitzler R, Hadaschik D, Smola H, Mauch C, Krieg T, Pfister H. CD40L induces matrix-metalloproteinase-9 but not tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cervical carcinoma cells: imbalance between NF-kappaB and STAT3 activation. **Exp Cell Res**, Jul 15, v.267(2), p.205-15, 2001.

Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, Zigrino P, Smola H, Pfister HJ. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. **J Gen Virol**, May, v.86(Pt 5), p.1291-6, 2005.

Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D, Lindberg RL. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. **Cancer**, v.97(11), p.2710-5, 2003.

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol**, Review. v.200(4), p.448-64, 2003.

Sternlicht MD & Werb Z. How matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p.463-516, 2001.

Sun Y, Eluf-Neto J, Bosch FX, Munoz N, Walboomers JM, Meijer CJ, Shah KV, Clayman B, Viscidi RP. Serum antibodies to human papillomavirus 16 proteins in women from Brazil with invasive cervical carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.8(10), p.935-940, 1999.

Swanton C & Jones N. Strategies in subversion: de-regulation of the mammalian cell cycle by viral gene products. **Int J Exp Path**, v.82, p.3-13, 2001.

Takahashi C, Akiyama N, Matsuzaki T, Takai S, Kitayama H, Noda M. Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-Ras oncogene. **Oncogene**, v.12(10), p.2137-46, 1996.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95(22), p.13221-6, 1998.

Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M, Wada H, Tanaka F. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. **Eur J Cancer**, v.40(10), p.1617-23. 2004

Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, Ikeda N, Fujii H, Koyama F, Mukogawa T, Matsumoto H, Kondo S, Takahashi C, Noda M, Nakajima Y. 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**, v.10(16), p.5572-9, 2004

Takino T, Miyamori H, Watanabe Y, Yoshiota K, Seiki M, Sato H. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Regulates Collagen-Dependent Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Related Kinase Activation and Cell Migration. **Cancer Res**, v. 64, p.1044-49, 2004.

Théret N, Lehti K, Musso O, Clément B. MMP2 Activation by Collagen I and Concavalin A in Cultured Human Hepatic Stellate Cells. **Hepatology**, v.30(2), p.462-68, 1999.

Vazquez-Ortiz G, Ciudad CJ, Pina P, Vazquez K, Hidalgo A, Alatorre B, Garcia JA, Salamanca F, Peralta-Rodriguez R, Rangel A, Salcedo M. Gene identification by cDNA arrays in HPV-positive cervical cancer. **Arch Med Res**, Sep-Oct, v.36(5), p.448-58, 2005 .

Villa LL, Bernard HU, Kast M, Hildesheim A, Amestoy G, Franco EL. Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference -HPV 2001. **Virus Research**, v.89, p.163-73, 2002.

Waggoner SE. Cervical Cancer. **Lancet**, Review. v.361(9376), p.2217-25, 2003.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v.189(1), p.12-9, 1999.

Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR, Johanning GL. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. **Cancer**, Apr 15;v.94(8), p.2199-210, 2002.

Welm B, Mott J, Werb Z Developmental biology: vasculogenesis is a RECK without RECK. **Curr Biol**, Review. **v.12(6)**, p.R209-11, 2002.

Wolf JK, Franco EL, Arbeit JM, Shroyer KR, Wu TC, Runowicz CD, Tortolero-Luna G, Herrero R, Crum CP. Innovations in understanding the biology of cervical cancer. **Cancer, Review**. V.98(9 Suppl), p.2064-9, 2003.

Woodhouse E, Chuaqui RF, Liotta LA. General Mechanisms of Metastasis. **CANCER, Supplement v.80(8)**, p.1529-37, 1997.

Wright TC Jr, Cox JT, Assad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. 2001. Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Obstet Gynecol**, v.189(1), p.295-304, 2003.

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, v.36(1), p.128-37, 2003.

Zhai Y, Hotary KB, Nan B, Bosch FX, Munoz N, Weiss SJ, Cho KR. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. **Cancer Res**, Aug 1, v.65(15), p.6543-50, 2005.

Zhou CY, Yao JF, Chen XD. Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and their inhibitor-TIMP 1,2 in human squamous cell carcinoma of uterine cervix. **Ai Zheng**, v.21(7), p.735-9, 2002.

zur Hausen H Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, Review. **v.2(5)**, p.342-50. 2002.

APÊNDICE A

Tempo de dobramento das linhagens SiHa , CaSki e C33A calculados entre o 5º e 7º dias da curva de crescimento.

Quadro 1: Tempo de dobramento das linhagens de carcinoma cervical humano cultivadas em substratos de matriz extracelular e no plástico como controle.

Tempo de dobramento (horas)			
Substratos	SiHa	CaSki	C33A
Plástico	42,7	54,7	22,2
Colágeno	109,7	83,4	25,3
Matrigel	42,9	36,8	18,7

Análise estatística dos dados de zimografia utilizando o ANOVA (Tukey). Todos os géis foram feitos em quadruplicata..

Quadro 6: Análise estatística dos dados de zimografia utilizando o teste de variância

Dados Estatísticos de Zimografia utilizando ANOVA (Tukey)		
<i>Mesma linhagem nos diferentes substratos:</i>		
<i>P=plástico, C=colágeno, M=matrigel</i>		
	MMP-2	MMP-9
SiHa	PxC *	PXC P>0.05
	PxM P>0.05	PXM P>0.05
	CxM *	CXM P>0.05
CaSki	PxC P>0.05	PxC *
	PxM P>0.05	PxM P>0.05
	CxM *	CxM P>0.05
C33A	PxC **	PXC P>0.05
	PxM P>0.05	PXM P>0.05
	CxM *	CXM P>0.05
<i>Mesmo substrato nas diferentes linhagens:</i>		
<i>S=SiHa, Ca=CaSki, C=C33A</i>		
	MMP-2	MMP-9
Plástico	SxCa P>0,05	SxCa P>0.05
	SxC **	SxC P>0.05
	CaxC **	CaxC P>0.05
Colágeno	SxCa P>0.05	SxCa P>0.05
	SxC P>0.05	SxC P>0.05
	CaxC P>0.05	CaxC P>0.05
Matrigel	SxCa P>0.05	SxCa P>0.05
	SxC P>0.05	SxC P>0.05
	CaxC P>0.05	CaxC P>0.05

Obs: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Apêndice C

Tabelas com os valores de expressão gênica utilizando a fórmula $2^{\text{delta-delta Ct (DDCt)}}$ dos genes analisados. Cada coleta foi normalizada por C33A plástico correspondente.

Quadro 7: Valores de expressão gênica de RECK utilizando GAPDH como gene constitutivo.

Amostras de RECK x GAPDH					
	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	Média	Desvio-padrão
SiHa P	1,06	0,97	0,99	1,01	0,05
SiHa C	1,57	1,69	1,04	1,44	0,35
SiHa M	1,22	1,55	0,63	1,13	0,47
CaSki P	4,76	8,97	6,25	6,66	2,14
CaSki C	3,56	7,65	3,94	5,05	2,26
CaSki M	3,72	4,76	2,67	3,71	1,05
C33A P	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
C33A C	1,63	1,86	3,08	2,19	0,78
C33A M	1,38	1,88	1,53	1,59	0,26

Quadro 8: Valores de expressão gênica de MMP-2 utilizando GAPDH como gene constitutivo.

Amostras de MMP-2 x GAPDH					
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	Média	Desvio-padrão
SiHa P	15,67	13,13	16,34	15,05	1,69
SiHa C	26,45	16,39	22,94	21,93	5,10
SiHa M	66,72	15,83	58,08	46,88	27,23
CaSki P	8,82	7,86	9,22	8,63	0,70
CaSki C	78,79	9,88	20,97	36,55	37,00
CaSki M	102,18	13,64	30,06	48,63	47,10
C33A P	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
C33A C	11,04	7,49	3,26	7,26	3,90
C33A M	34,54	1,05	1,68	12,42	19,15

Quadro 9: Valores de expressão gênica de MMP-9 utilizando GAPDH como gene constitutivo.

Amostras de MMP-9 x GAPDH					
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	Média	Desvio-padrão
SiHa P	0,03	0,82	0,25	0,4	0,4
SiHa C	0,02	0,31	0,22	0,2	0,1
SiHa M	0,01	6,63	0,35	2,3	3,7
CaSki P	0,02	5,24	2,12	2,5	2,6
CaSki C	0,80	0,29	0,24	0,4	0,3
CaSki M	0,29	5,64	2,76	2,9	2,7
C33A P	1,00	1,00	1,00	1,0	0,0
C33A C	0,21	0,45	4,00	1,6	2,1
C33A M	5,64	1,71	5,74	4,4	2,3

Quadro 10: Valores de expressão gênica de MT1-MMP utilizando GAPDH como gene constitutivo.

Amostras de MT1-MMP x GAPDH					
	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	Média	Desvio-padrão
SiHa P	33,47	26,70	28,25	29,47	3,55
SiHa C	47,18	78,52	42,96	56,22	19,43
SiHa M	24,59	37,92	41,07	34,53	8,75
CaSki P	19,09	19,29	16,00	18,13	1,85
CaSki C	22,47	27,66	21,93	24,02	3,16
CaSki M	10,78	9,51	8,51	9,60	1,13
C33A P	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
C33A C	0,68	1,34	1,91	1,31	0,61
C33A M	0,36	1,60	3,13	1,69	1,39

Quadro 11: Valores de expressão gênica de TIMP-2 utilizando GAPDH como gene constitutivo.

Amostras de TIMP-2 x GAPDH					
	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	Média	Desvio-padrão
SiHa P	17,57	14,07	15,03	15,56	1,81
SiHa C	23,51	34,78	34,54	30,94	6,44
SiHa M	29,86	24,00	40,93	31,60	8,60
CaSki P	4,92	9,55	18,51	10,99	6,91
CaSki C	7,31	20,89	13,13	13,78	6,81
CaSki M	7,41	5,96	10,02	7,80	2,06
C33A P	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
C33A C	1,08	0,92	2,52	1,51	0,88
C33A M	2,64	0,85	2,35	1,95	0,96

Apêndice D

Curvas de dissociação de cada gene analisado, bem como do gene constitutivo.

Figura 12: Curvas de dissociação de GAPDH após reação de real-time PCR. Para cada amostra das triplicatas biológicas foram feitas duplicatas dos poços. Como controle utilizamos poços sem amostra, NTC (no template control).

Figura 13: Curvas de dissociação de RECK após reação de real-time PCR. Para cada amostra das triplicatas biológicas foram feitas duplicatas dos poços. Como controle utilizamos poços sem amostra, NTC (no template control).

Figura 14: Curvas de dissociação de MMP-2 após reação de real-time PCR. Para cada amostra das triplicatas biológicas foram feitas duplicatas dos poços. Como controle utilizamos poços sem amostra, NTC (no template control).

Figura 15: Curvas de dissociação de MMP-9 após reação de real-time PCR. Para cada amostra das triplicatas biológicas foram feitas duplicatas dos poços. Como controle utilizamos poços sem amostra, NTC (no template control).

Figura 16: Curvas de dissociação de MT1-MMP após reação de real-time PCR. Para cada amostra das triplicatas biológicas foram feitas duplicatas dos poços. Como controle utilizamos poços sem amostra, NTC (no template control).

Figura 17: Curvas de dissociação de TIMP-2 após reação de real-time PCR. Para cada amostra das triplicatas biológicas foram feitas duplicatas dos poços. Como controle utilizamos poços sem amostra, NTC (no template control).

Apêndice E

Gráficos referentes à validação da análise de expressão utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001). O pool utilizado para fazer as diluições necessárias para a validação era composto por amostras das três linhagens, cultivadas nos três diferentes substratos, além de uma amostra de queratinócito, que é a linhagem não tumoral correspondente às linhagens utilizadas neste estudo.

Figura 18: Validação da expressão gênica de RECK.

Coefficiente angular: -0,099963624

Figura 19: Validação da expressão gênica de MMP-2

Coefficiente angular: 0,059156502

Figura 20: Validação da expressão gênica de MMP-9

Coefficiente angular: 0,4660438

Figura 21: Validação da expressão gênica de MT1-MMP

Coefficiente angular: 0,09206957

Figura 22: Validação da expressão gênica de TIMP-2

Coefficiente angular: 0,113851723.