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

Ação da amilóide sérica A em linhagens celulares de
glioma humano

Franciele Hinterholz Knebel

Dissertação para obtenção do
grau de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2010

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

Ação da amiloide sérica A em linhagens celulares de
glioma humano

Franciele Hinterholz Knebel

Dissertação para obtenção do
grau de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2010

Franciele Hinterholz Knebel

Ação da amilóide sérica A em linhagens celulares de glioma
humano

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Dra. Ana Campa
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2010.

Aos meus pais, Liane Hinterholz
Knebel e Luís Carlos Knebel pelo apoio
e amor incondicional e por iluminarem
minha caminhada com o brilho dos
seus olhares. Dedico-lhes esta
conquista como gratidão.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

Quero agradecer a todos que fizeram parte desta história...

A Deus que com seu amor infinito iluminou os meus caminhos, meus gestos e minhas palavras para que esta oportunidade se tornasse realidade.

Aos meus pais que com amor incondicional respeitaram e acreditaram em minhas escolhas. Agradeço o incentivo constante, o amor, o carinho, a compreensão nos momentos difíceis e à vida.

À profa. Dra. Ana Campa pela oportunidade, confiança e orientação criteriosa. Sou grata pelo incentivo, pelo companheirismo, pela dedicação, pelas conversas e compartilhamento de curiosidades que permearam esta pesquisa.

À profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler pela doação das linhagens celulares utilizadas neste estudo. Obrigada pelas sugestões e discussões e por disponibilizar o laboratório de Patologia sempre que necessário. A todos os colegas e amigos do laboratório de Patologia: Karla, Laura, Camila, Tatiana, Rafael, Manoela, Diogo e Rebeca. Em especial, ao Msc. Renato Massaro que sempre solícito me acompanhou até o equipamento de RT-PCR e contribuiu com discussões sempre construtivas, além é claro, obrigada, pela amizade.

A Msc. Renata Chaves Albuquerque pela colaboração, pelo auxílio aos experimentos e pelas discussões.

Ao prof. Dr. Hugo Armelin por disponibilizar seu equipamento cintilador.

A profa. Dra. Ohara Augusto e a técnica Edilaine por disponibilizar o analisador de quimiluminescência.

Ao prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida por disponibilizar timidina triciada.

Ao prof. Dr. Mário Hirata e a profa. Dra. Rosário Hirata por disponibilizarem seu laboratório para a realização dos ensaios de RT-PCR.

À prof. Dra. Alison Colquhoun e Dra. Ana Lepique por comporem minha banca de qualificação do mestrado e fazerem leitura crítica, contribuindo para o aperfeiçoamento do trabalho.

À banca examinadora, que dispensou seu tempo para a leitura e estudo desta pesquisa e contribuiu com seus conhecimentos para a elaboração da versão final.

Ao Dr. Christian Colin pela disponibilidade de desenhar os primers da proteína amiloide sérica A.

A Leila Bonadio pela catalogação das referências bibliográficas.

Aos meus amigos de todas as horas do laboratório de Bioquímica Clínica: Silvana Sandri, Renata Chaves Albuquerque, Sabrina Okada, Silene Migliorini, Melissa Cavalheiro Tourino, Edson Mendes, Fabíola Branco Fillipin, Carolina Ramos Moreno, Andressa Greco Franco, Melissa Medrano Gomes, Wilton Salgado Filho, Caroline Contesini, Talita Iacovella pelo companheirismo, as diárias conversas científicas, as discussões sempre construtivas, o apoio, as bobagens, enfim, este convívio engrandeceu a mim e a esta pesquisa.

À Dra. Silvana Sandri, pelo "help" sempre bem-vindo quando as dúvidas a respeito da Amiloide Sérica surgiam. Muito obrigada por ser esta pessoa sempre solícita e compartilhar comigo suas experiências científicas.

À Silene Migliorini, nossa cherife boníssima, sempre tão dedicada ao nosso laboratório. Obrigada por manter a ordem sempre que o caos laboratorial se instalava.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica Clínica e Toxicológicas pela convivência e troca de experiências.

Às minhas amigas (os): Suélen dos Santos, Karla Santiago, Simone Sartoretto, Graziela Romagnoli, Andréia Neves, Cíntia Bombardieri, Cassiano Carromeu, Camila Stumm, Luciane Capelo, Amanda Moura, Renata Arcaldi, Karla Abdo Brohem, Renato Massaro e Karen Spadari pelo suporte emocional. Agradeço as palavras de incentivo, os chamas, os pastéis na feira, o carinho, o sorriso, o olhar de apoio, o abraço apertado, enfim... os maravilhosos momentos que passamos junta(o)s.

À equipe de funcionários do bloco 17 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela excelente prestatividade. Em especial à Ana, Edna, Dora e Suely. Ao Jorge e a Elaine da sessão de pós-graduação. À Carmen, Dorley, Rose e Cláudia. O trabalho de vocês foi essencial para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho.

A toda minha família pelo apoio e incentivo constante. Mesmo distantes, cada ligação recebida, cada palavra dita foram imprescindíveis para que eu me tornasse mais forte para prosseguir nesta jornada.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, o meu muito obrigado.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro imprescindível para concretização desta pesquisa.

ÍNDICE

1	Lista de Abreviaturas.....	10
2	Índice de Tabelas e Figuras.....	12
3	RESUMO.....	13
4	ABSTRACT.....	14
5	INTRODUÇÃO.....	15
5.1	Os Tumores da Glia.....	15
5.2	Amilóide Sérica A.....	17
5.3	Inflamação, Câncer e SAA.....	21
5.4	Efeito do Óxido Nítrico em tumores.....	22
5.5	Matriz Extracelular, MMPs e RECK.....	23
6	OBJETIVOS.....	26
7	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
7.1	Condições de Cultura e Manutenção das linhagens.....	27
7.2	Avaliação da viabilidade e crescimento das linhagens de glioma.....	27
7.3	ELISA.....	28
7.3.1	Preparo da placa.....	28
7.3.2	Procedimento de dosagem.....	29
7.4	Determinação de produtos do Óxido Nítrico.....	30
7.5	Expressão Gênica.....	30
7.5.1	Extração de RNA Total.....	30
7.5.2	Qualidade dos RNAs.....	31
7.5.3	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time – PCR).....	31
7.5.3.1	Preparação dos cDNAs.....	31
7.5.4	q-PCR para quantificação de expressão relativa.....	31
7.6	Determinação da proteína SAA.....	33
7.7	Proliferação Celular por [³ H]Timidina.....	33
7.8	Migração celular.....	34
7.9	Invasão celular <i>in vitro</i>	34
7.10	Análise Estatística.....	35
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
8.1	Efeito da SAA sobre a produção de citocinas.....	35
8.2	SAA induziu produção de óxido nítrico.....	36
8.3	Expressão de SAA, MMPs e RECK nos gliomas A172 e T98G.....	37
8.4	SAA afetou a expressão dos genes MMP-2, MMP-9 e RECK.....	41
8.5	SAA induziu proliferação celular.....	42
8.6	SAA afetou migração celular.....	46
8.7	SAA afetou invasão celular.....	47
8.8	As diferentes isoformas da SAA foram induzidas por IFN- γ	49
8.9	SAA é produzida pelos gliomas e sua produção é aumentada por IFN- γ	50
9	CONCLUSÕES.....	51
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1 Lista de Abreviaturas

Apo-1: apolipoproteína I

BrdU: bromodeoxiuridina

CLA-1: CD36 and LIMP II analogous-1 receptor

COX-2: ciclooxygenase-2

DAB: 3,3 diaminobenzidina

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Enzyme – Linked Immunosorbent Assay

FAD: dinucleotídio de flavina e adenina

FMN: mononucleotídio de flavina adenina

FPRL-1: receptor de baixa afinidade ao fMLP like 1

GBM: glioblastoma multiforme

H4B: tetrahidrobiopterina

HDL: lipoproteína de alta densidade

IFN- γ : interferon-gama

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-10: interleucina-10

IL-2: interleucina-2

IL-1ra: receptor antagonista para interleucina 1

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

iNOS: óxido nítrico sintase indutível

LPS: lipopolissacarídeo

M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos

MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos.

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinase de matriz

Myc: proto-oncogene, se liga ao DNA, pode causar câncer

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintases

p21: regulador de transição do ciclo celular

p53: supressor de tumor relacionado ao *check point* do ciclo celular

PI: iodeto de propídio

PBS: tampão fosfato

PBSA: tampão fosfato livre de cálcio e magnésio

PCR-RT: reação da transcriptase reversa seguido da reação em cadeia da polimerase.

q-PCR-RT: reação quantitativa da transcriptase reversa seguido da reação em cadeia da polimerase.

RAGE: receptor para produtos finais de glicação avançada.

Ras: proto-oncogene, pode causar câncer

RECK: reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs

Rb: proteína retinoblastoma

ROS: espécies reativas de oxigênio

SAA: amilóide sérica A

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

TCA: ácido tricloroacético

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz

TLR: receptor *Toll-like*

TLR4: receptor *Toll-like* -4

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

2 Índice de Tabelas e Figuras

Tabela 1: Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	32
Tabela 2: Valor do slope dos diferentes genes para validação experimental pelo método de Delta-Delta Ct para os genes do estudo. Notar todos os valores de slope ou inclinação da reta, inferiores a 0,1.....	38
Figura 1: Aspecto das culturas A172 e T98G.....	16
Figura 2: Produção de IL-8 pelos gliomas na presença e ausência da SAA....	36
Figura 3: SAA estimula a produção de NO na linhagem A172 e T98G.....	37
Figura 4: eficiência de amplificação dos gene do estudo. Notar os valores de R^2 próximo a 1 para inclinação da reta.....	38
Figura 5: Expressão gênica quantitativa comparativa dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 nos gliomas do estudo.....	40
Figura 6: Expressão gênica quantitativa comparativa entre os genes MMP-2, MMP-9 e RECK nos gliomas do estudo.....	41
Figura 7: Expressão gênica quantitativa dos genes MMP-2, MMP-9 e RECK na linhagem A172 e T98G na presença e ausência da SAA.....	42
Figura 8: Cinética de crescimento das linhagens A172 e T98G em diferentes condições: meio DMEM enriquecido com 10% de FBS e meio DMEM deficiente em SFB (0,5%) na ausência e presença de SAA.....	43-44
Figura 9: proliferação celular induzida por SAA nas linhagens de glioma.....	45
Figura 10: SAA afeta a motilidade das células de glioma.....	46-47
Figura 11: SAA inibe a invasão da A172 e é um quimioatraente para T98G....	48
Figura 12: Expressão gênica quantitativa das diferentes isoformas de SAA na linhagem celular A172.....	49
Figura 13: Expressão gênica quantitativa das diferentes isoformas de SAA na linhagem celular T98G.....	49
Figura 14: produção da proteína SAA induzida por IFN- γ pelas linhagens A172 e T98G.....	50
Figura 15: Possíveis ações da SAA sobre tumores.....	51

Aluna: Franciele Hinterholz Knebel

e-mail: fhknebel@usp.br

Orientadora: Ana Campa

Nível: mestrado

Título: Ação da amiloide sérica A em linhagens celulares de glioma humano

Volume: I **Número de páginas:** 60

3 RESUMO

Apesar das evidências apontarem à participação da amiloide sérica A (SAA) em processos que favorecem a carcinogênese e metástase, associado à proposta da SAA como um marcador de progressão tumoral, não há ainda nenhum estudo avaliando a atividade direta da SAA em células tumorais. Este estudo examinou o efeito direto da SAA em duas linhagens de glioma humano. Gliomas são tumores cerebrais primários mais comuns em adultos e as linhagens deste estudo, A172 e T98G, representam carcinomas humanos caracterizados por um comportamento biológico altamente agressivo e quase sempre fatais, sendo classificados como grau IV. As linhagens A172 e T98G possuem algumas diferenças importantes em relação à invasividade; elas são respectivamente menos invasiva e mais invasiva. Para este estudo, avaliamos o efeito de SAA sobre a síntese de compostos representativos de algumas das diferentes classes de substâncias que estão envolvidas na progressão do tumor; entre elas estão a citocina IL-8, IL-6, TNF- α , a molécula mensageira NO, as metaloproteases, MMP2 e MMP9 e o gene RECK. Além disso, nos perguntamos se SAA pode estar envolvida nos processos de proliferação, migração e invasão celular. SAA induziu a produção de NO em ambas as linhagens de glioma. Em relação a IL-8 observamos que sua produção basal é bastante diferente dependendo da linhagem, sendo pouco produzida pela linhagem A172 que foi a única que respondeu à SAA. IL-6 e TNF- α não foram produzidas pelos gliomas quando estimulados com SAA. O tratamento das células com SAA aumentou a expressão das MMP-2 e MMP-9 e diminuiu a de RECK em ambas as linhagens. SAA mostrou ser um estímulo mitogênico para os gliomas T98G e A172. SAA aumentou a migração e invasão da linhagem T98G e inibiu estes mesmos parâmetros nas células A172. SAA é constitutivamente expressa e produzida por ambas as linhagens, sendo que a isoforma SAA1 é a predominante. A expressão gênica de todas as isoformas, SAA1, SAA2, SAA4, e a síntese protéica das SAA foram aumentadas pela adição de IFN- γ . Nossos resultados com base em ensaios *in vitro* suportam uma contribuição direta da SAA para a progressão e metástase do tumor, dependendo do tipo de célula e concentração da SAA. O fato de que IFN- γ é um indutor de SAA nos gliomas aponta que SAA pode exercer tanto um efeito intrácrico quanto autócrino ou parácrino nos tumores.

Palavras-chave: Amiloide sérica A. Migração. Proliferação. Invasão. Gliomas.

Student: Franciele Hinterholz Knebel **e-mail:** fhknebel@usp.br
Supervisor: Ana Campa
Level: Master of Sciences
Title: Action of serum amyloid A in cell lineages of human glioma
Volume: I **Pages:** 60

4 ABSTRACT

In spite of the evidences sustaining the participation of SAA in processes that favor carcinogenesis and metastasis, and the proposal of SAA as a marker of tumor progression, no studies have yet addressed a potential direct activity of SAA on tumor cells. This study examined the direct effect of SAA on two human glioma lineages. Gliomas are primary brain tumors more common in adults and the lineages of this study, A172 and T98G, represent human carcinomas characterized by a highly aggressive biological behaviour and almost always fatal, classified as grade IV. A172 and T98G have some important differences in the invasiveness, they are less invasive and more invasive, respectively. For this study, we evaluated the effect of SAA on the synthesis of compounds representing different classes of substances that are somehow involved in tumor progression, among them we can cite the cytokine IL-8, the messenger molecule NO, the metalloproteinases MMP2 and MMP9 and RECK gene. Furthermore, we wonder if SAA was involved in the processes of proliferation, migration and cell invasion. SAA stimulated the production of IL-8 in lineage A172, while T98G produced high amounts of IL-8 that were not modified by SAA addition. SAA did not stimulate the production of IL-6 and TNF- α . SAA induced the production of NO, increased the expression of MMP-2 and MPP-9 and decreased the regulator of the expression of the MMPs; gene RECK. Moreover, we observed that SAA was a mitogenic stimulus, but it had a dual effect on migration and invasiveness behavior depending on cell lineage. For T98G SAA increased migration and invasion, and for A172 SAA inhibited migration and invasion. SAA was constitutively expressed and produced by both strains, and the isoform SAA1 predominated. The gene expression of all isoforms, SAA1, SAA2, SAA4, and protein synthesis of SAA were increased by the addition of INF- γ . Our findings based on in vitro assays support a direct contribution of SAA to tumor development, progression and metastasis depending on the cell type and concentration of SAA. Besides the role of SAA on tumor growth during an acute phase, the fact that SAA was expressed in tumor cells suggests an intracrine or an autocrine action of SAA.

Key words: Serum amyloid A. Migration. Proliferation. Invasion. Gliomas.

5 INTRODUÇÃO

5.1 Os Tumores da Glia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) são diagnosticados cerca de dez milhões de novos casos de câncer a cada ano no mundo e estima-se que em 2020, esse número subirá para 15 milhões. O câncer cerebral se encontra entre as dez primeiras causas de óbito por neoplasias, embora seja muito raro. Destes, os gliomas representam aproximadamente 50% de todos os tipos de tumores da glia em adultos (Jemal et al., 2006).

Os tumores da glia são originados a partir das células da neuroglia transformadas. A neuroglia é formada por quatro tipos de células: os astrócitos, oligodendrócitos, endotélio e microglia. Os gliomas são classificados pela OMS de acordo com o tipo celular, morfologia, proliferação, necrose e características clínicas em: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso ou oligodendroglioma (grau II), astrocitoma ou oligodendroglioma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (Maher et al, 2001). A classificação em escala de I a IV dos gliomas está relacionada ao grau de malignidade dos mesmos. Indivíduos diagnosticados com astrocitomas de menor grau apresentam progressão inevitável à astrocitomas de maior grau (Rao, 2003; Guillemin et al., 2008).

As linhagens deste estudo, denominadas, A172 e T98G (**Figura 1**), são glioblastomas multiformes (GBMs), altamente invasivos, derivados de astrócitos transformados e de grau avançado. Estudos epidemiológicos mostram que menos de 3% dos pacientes diagnosticados com GBMs vivem até cinco anos após o diagnóstico. O reaparecimento de um GBM após intervenção cirúrgica para retirada do mesmo é comum devido a sua elevada taxa de invasão local e resistência a terapia (Cordes et al., 2003; Wang et al., 2003). A denominação multiforme dos glioblastomas se deve à presença de regiões de necrose e hemorragia, núcleos e células pleomórficas e proliferação microvascular, além de inúmeras deleções, amplificações e mutações de ponto, bem como infiltração difusa das estruturas cerebrais vizinhas (Holland, 2000).

Figura 1: Aspecto morfológico das culturas A172 e T98G. A linhagem A172 apresenta morfologia semelhante aos prolongamentos neurais, enquanto a linhagem T98G é mais arredondada. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x.

A etiologia dos gliomas não é bem compreendida, entretanto, estudos sugerem que o ambiente cerebral é mais suscetível ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica, devido a grande quantidade de ácidos graxos facilmente oxidado, ao elevado consumo de oxigênio e ao pequeno número de enzimas antioxidantes se comparado a outros tecidos. Estes fatores poderiam induzir danos no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células cerebrais (Barbin et al., 2003). Outra pesquisa mostra que indivíduos com histórico familiar de GBMs na família são mais suscetíveis a desenvolver os mesmos (Andrade et al., 2001) e que a exposição ocupacional a produtos como arsênico, mercúrio e petróleo contribuem para o aumento do risco de desenvolver gliomas (Navas-Acien, 2002). Portanto, compreender os fatores que estimulam o fenótipo agressivo destes tumores será importante para geração de alvos terapêuticos chave.

5.2 Amilóide Sérica A

A proteína Amilóide Sérica A (SAA) é uma apolipoproteína de 104 aminoácidos com aproximadamente 12 kDa, altamente conservada entre as espécies e existente sob três isoformas em humanos – SAA1, SAA2 e SAA4. As isoformas SAA1 e SAA2 são genes que codificam SAA de fase aguda, enquanto SAA4 codifica um gene constitutivo de função ainda desconhecida. Em concentrações basais, as concentrações séricas de SAA variam de 1-10µg/mL. Na resposta inflamatória aguda, o aumento da concentração sérica desta apolipoproteína chega a 1000 vezes. A elevação inicial de SAA na resposta de fase aguda é acompanhada por um declínio gradual na concentração plasmática depois de 72 horas e retorno a concentrações basais depois de 5-7 dias (Gabay & Kushner, 1999).

Na circulação sanguínea, SAA é transportada até o foco inflamatório associada à lipoproteína de alta densidade (HDL). A região α -hélice na porção amino terminal da SAA permite a ligação da SAA à HDL, após deslocamento da apo-I por competição, uma vez que SAA se liga ao mesmo sítio da apo-I. Sua dissociação no foco inflamatório torna a mesma um potente estímulo de células inflamatórias (Furlaneto et al., 2000).

Apesar da SAA ser uma proteína seqüenciada e altamente conservada entre as espécies, os estudos referentes à sua estrutura e papel biológico não foram totalmente esclarecidos. Nos últimos anos, nosso grupo tem contribuído para a compreensão dos efeitos biológicos da SAA em células do sistema imune. A coincidência temporal entre o aumento da concentração plasmática da SAA e a migração de células inflamatórias para o foco inflamatório tem estimulado as investigações. Neste sentido, nosso grupo tem descrito alguns efeitos da SAA sobre a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos e monócitos, aumento do *pool* de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela sensibilização de leucócitos (Furlaneto & Campa, 2000; Ribeiro et al. 2003; Hatanaka et al. 2004; Hatanaka, Ribeiro & Campa, 2003) e, recentemente, descrevemos que a SAA é um potente indutor da produção de óxido nítrico (NO) via indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em células peritoneais de camundongos. Nesse mesmo trabalho apontamos ainda o receptor Toll-like-4 (TLR-4) como possível responsável por tais efeitos (Sandri, et al. 2008).

Vários outros estudos mostram o efeito de SAA sobre células do sistema imune, por exemplo, de acordo com Lee e colaboradores (2005; 2008), concentrações baixas de SAA estimulam a expressão de TNF- α (citocina pró-inflamatória), contribuindo para o aumento da inflamação. Enquanto, concentrações elevadas de SAA estimulam a expressão de IL-10 (antiinflamatória), contribuindo para inibição da inflamação.

A indução da síntese da SAA está diretamente relacionada a fatores envolvidos na resposta inflamatória de fase aguda, como: lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), caseína, turpentina, nitrato de prata, algumas citocinas, como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-2, interferon- γ (IFN- γ) e o fator neutrófico ciliar (para revisão ver Urieli-shoval et al., 2000). Apesar do fígado ser o principal produtor de SAA, sítios extra-hepáticos como células do músculo liso, células endoteliais (Kumon et al. 1997), monócitos (Yamada et al., 2000), adipócitos (Poitou & Viguerie, 2005), microglia de pacientes com doença de alzheimer, tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, lesões ateroscleróticas (Rodrigues et al., 2003); (Bogdan, 2001); (Sodhi & Biswas, 2001), além de células tumorais também serem capazes de produzir SAA (Gutfeld et al., 2006).

Importante constatação realizada por Biran e colaboradores já em 1986 relacionava concentração sérica de SAA e sobrevida de pacientes com câncer. Nesta pesquisa, a média de sobrevivência dos pacientes em estágio terminal foi significativamente menor naqueles que possuíam concentração maior que 10µg/mL de SAA se comparado aqueles com concentração menor que 10µg/mL de SAA. Ainda neste estudo, foi constatado que os níveis mais elevados de SAA foram em pacientes com carcinoma metastático se comparado a indivíduos com carcinoma localizado. Em 2003, usando tecnologia proteômica e espectrometria de massa, SAA foi identificada como a proteína significativamente mais diferenciada em pacientes com câncer de pulmão se comparado a pacientes saudáveis (Howard et al., 2003). Estes achados, somados a outros mais recentes permitiu atribuir a SAA a função de marcadora tumoral (para revisão ver Malle et al., 2009).

Muito da ação da SAA no contexto da inflamação parece compartilhar similaridades com processos de invasão, migração e proliferação de tumores. Por exemplo, SAA aumenta a adesão de linfócitos à matriz extracelular resultando no acúmulo de linfócitos e promovendo a migração de células (Badolato et al. 1994; Preciado-Patt et al. 1996) e liberação de metaloproteases que degradam os componentes da membrana basal (Migita et al. 1998). No contexto do tumor, este mesmo processo favoreceria a penetração de células tumorais nos vasos sanguíneos, linfáticos e tecidos adjacentes, e ativaria a migração celular, resultando em novos sítios tumorais (Rundhaug, 2005).

A invasão, migração e proliferação tumoral é resultante de vias sinalizadoras envolvidas com crescimento celular, expressão de oncogenes e deleção de genes supressores de tumores, expressão e liberação de metaloproteases, entre outros. Genes supressores de tumores atuam bloqueando o crescimento e a proliferação celular, enquanto proto-oncogenes possuem a função de acelerar a fase G1 do ciclo celular, permitindo o crescimento das células. Sabe-se também que as MMPs são ativadas por citocinas e fatores de crescimento (Weinberg, 1991; Evdokiou & Cowled, 1998). Considerando o que já foi estudado para a SAA em relação a produção de citocinas por leucócitos, poderíamos supor que caso a SAA tivesse o mesmo efeito em tumores, a SAA poderia afetar ciclo celular e/ou regular MMPs

ativadas por citocinas, modificando os processos de invasão, migração e proliferação celular.

Até o momento foram descritos 6 receptores para SAA: Tanis, CLA-1, RAGE, FPRL1, TLR-4 e TLR-2. Tanis é o receptor hepático para SAA regulado por glicose (Walder, 2002). CLA-1 é amplamente expresso em monócitos e através desse receptor SAA promove liberação de IL-8 e ativação da via de sinalização das MAPK (Baranova et al., 2005). O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) foi descrito como um multiligante encontrado em células mononucleares, proposto como propagador da inflamação e ligante para SAA (Cai et al., 2007). O *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL1) é um receptor transmembrana associado à proteína G (Lee et al., 2008). TLR-4 foi sugerido como ligante para SAA por Sandri et al. (2008), induzindo a produção de óxido nítrico por macrófagos. TLR-2 foi sugerido como um receptor para SAA por Madan e Amar (2008) quando o estímulo com um agonista de TLR-2 induziu aumento das concentrações séricas de SAA.

Dentre os receptores acima citados, vale mencionar aqueles que foram descritos em alguma célula do SNC. A expressão do FPRL1, inicialmente descrita em leucócitos, foi mostrada em diferentes tipos celulares, incluindo células da microglia, astrócitos e neurônios (para revisão ver Migeotte et al., 2006; Le et al., 2002; Becker et al., 1998; Harada et al., 2004). De acordo com Su et al. (1999), SAA ligada ao FPRL1 é quimioatraente para monócitos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos T e estimula a produção de metaloproteases, citocinas e receptores de citocinas. Zhou et al (2005) também mostrou que FPRL1 é altamente expresso em células de glioma humano e sua ativação parece estar relacionada a processos como motilidade, crescimento e angiogênese em glioblastomas. Além disso, em células monocíticas, a supressão da interação da SAA com o receptor FPRL1 parece inibir a atividade das MMP-2 e MMP-9 (Lee et al., 2005). Estes achados podem apontar para uma importante participação do FPRL1 no câncer.

O receptor RAGE também foi identificado em neurônios, microglia e astrócitos (Brett et al., 1993; Yan et al., 1996). Yan et al., em 2000 mostrou que a interação do RAGE com SAA em um modelo experimental de amiloidose resultou em aumento da expressão de M-CSF, o qual pode contribuir para o

crescimento de tumores. Além de FPRL1 e RAGE, astrócitos também expressam uma quantidade pequena de mRNA de TLR-2 e -4 (Jack et al., 2005).

5.3 Inflamação, Câncer e SAA

É reconhecido que a existência de uma inflamação persistente aumenta o risco de câncer. Isto porque após um dano ou infecção, todas as células inflamatórias - neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos - são recrutadas e esta intensa mobilização pode contribuir para o início da progressão do câncer (para revisão ver Federico et al., 2007).

O processo de carcinogênese inclui iniciação (seleção de células mutadas), promoção e progressão, como resultado do desequilíbrio entre proliferação e morte celular. Durante este processo geralmente há um aumento da expressão de proto-oncogenes (myc e ras) e decréscimo na atividade de genes supressores de tumores (p53 e Rb), colaborando para o crescimento do tumor (Hanahan & Weinberg, 2000). Durante este processo qualquer agente capaz de induzir proliferação celular aumenta o risco de transformação neoplásica. Para que células normais transformem-se em uma lesão pré-cancerosa, o dano inicial ao DNA deve resistir há inúmeras tentativas de reparo do mesmo (Federico et al., 2007).

No microambiente de tumores, várias citocinas estão relacionadas à proliferação. IL-8 atua na progressão de tumores por regular angiogênese, sobrevivência, crescimento e mobilidade, facilitando o desenvolvimento de metástases (Enewold et al., 2009). Em modelos roedores, tumores produzem citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-6 e quimiocinas. Essas atraem leucócitos para o foco inflamatório e facilitam o tráfego celular contribuindo para o desenvolvimento de metástases. TNF- α age ainda, como um fator de crescimento autócrino, induzindo a expressão de fatores de crescimento que estimulam a proliferação e sobrevivência de tumores pelo processo de angiogênese (Bharat et al. 2006).

A citocina IL-6 caracteriza-se por desenvolver ações pró e anti-inflamatórias e tem sido detectada em vários tumores epiteliais (Kishimoto, 2005). Inúmeros estudos mostram aumento dos níveis de IL-6 no soro de

vários pacientes com carcinomas de mama, pulmão e linfoma e este aumento está correlacionado com pior prognóstico, denunciando o papel oncogênico da IL-6 (Hong et al., 2007). Portanto, IL-6 pode ser importante no crescimento tumoral.

Quando pensamos no processo de proliferação é importante analisarmos o microambiente tumoral como um todo. Apesar do papel de alguns dos mediadores inflamatórios no microambiente tumoral terem sido estudados, o papel para muitos deles permanecem desconhecidos. O fato de SAA se mostrar um mediador inflamatório permite uma associação entre aumento da síntese de SAA com aparecimento e progressão de tumores. Assim, será interessante compreender o efeito da SAA sobre a produção de IL-8, TNF- α , IL-6 e M-CSF em células tumorais. As várias funções já atribuídas à proteína, relacionadas à migração de células do sistema imune para o foco inflamatório e sua ativação nos levou a acreditar que SAA possa ter participação em processos relacionados à carcinogênese e proliferação de tumores.

5.4 Efeito do Óxido Nítrico em tumores

O mesmo raciocínio feito acima para a participação de SAA como um elemento de ligação entre a produção de citocinas e câncer é válida para a produção de óxido nítrico (NO). Além das espécies reativas de oxigênio (ROS), o NO e produtos subsequentes, como o peroxinitrito, são gerados no meio intracelular e possuem funções na sinalização celular e também em eventos deletérios. Dentre as espécies reativas, o NO já foi descrito "in situ" em diferentes carcinomas (Balkwill, 2002; Fukumura et al., 2006).

Óxido nítrico é um radical livre, não estável e com uma meia vida de apenas cinco segundos. Sua produção é controlada por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (iNOS). A produção de NO consiste na conversão de L-arginina e L-citrulina via um composto intermediário, N^w-hidroxila-L-arginina (NOHarginina), na presença de oxigênio, NADPH e os cofatores mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e tetrahydrobiopterina (H₄B). A expressão da iNOS é modulada por

citocinas como IL-1, IFN- γ , TNF- α e produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos (Xie & Nathan, 1994; Xie, Kashiwabara & Nathan, 1994).

Há décadas sabe-se que a superprodução crônica de NO pode induzir citotoxicidade e replicação celular aumentada, sendo um fator de risco para muitos tipos de câncer (Ames & Gold, 1990). A reação de NO com radicais livres levando à oxidação de proteínas, lipídios e carboidratos induz uma perturbação na homeostase intra e intercelular que pode repercutir em desequilíbrio do potencial redox celular, instabilidade genômica e mutação do DNA (Federico et al., 2007).

A associação entre NO e câncer é bastante complexa e por vezes seus efeitos sobre diferentes etapas envolvidas na gênese e progressão tumoral são distintas. Por exemplo, iNOS induz p53 e causa parada do ciclo celular. Entretanto, em células mutadas para p53, iNOS aumenta a expressão de VEGF e promoveu crescimento do tumor, sugerindo que a atividade tumoricida de NO seja dependente do status de p53 do tumor (Ambs et al., 1998). Nos últimos anos, especialmente em estudos relacionados ao câncer, o NO tem despertado atenção pela sua natureza dualística: efeitos benéficos e deletérios, dependendo da concentração e do contexto biológico.

Nosso grupo descreveu que SAA aumenta a expressão de iNOS e produção de NO de macrófagos (Sandri et al. 2008) e que SAA aumenta ROS em neutrófilos e em fibroblastos imortalizados da linhagem 3T3-L1, sendo que neste último caso está relacionado ao aumento da proliferação (Dermagos, et al., submetido). O efeito da SAA sobre a produção de NO em células de glioma humano é desconhecido e é um dos objetivos deste estudo.

5.5 Matriz Extracelular, MMPs e RECK

A matriz extracelular (MEC) do sistema nervoso central (SNC) é uma mistura heterogênea de moléculas de proteoglicanos do tipo sulfato de condroitina, ácido hialurônico e outras glicoproteínas multiméricas do tipo tenascina (Sanes, 1989). Estas moléculas propiciam suporte para o tecido e regulam processos celulares como crescimento, migração, proliferação, invasão, adesão, expressão gênica, diferenciação e morte. Estes processos tornam-se viáveis pelo constante remodelamento da MEC e pelas interações célula-célula e

célula-matriz. A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares, que incluem as serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteases (MMPs) (Benaud et al., 1998). O plasminogênio e as MMPs são fatores responsáveis pela degradação dos componentes da MEC, como: proteoglicanos, tenascina, fibronectina e laminina (Vaday & Lider, 2000).

As MMPs são um grupo de enzimas proteolíticas dependentes de zinco que de acordo com a especificidade do substrato e a homologia de domínios, são subdivididas em collagenases, gelatinases, elastases e estromelisinases (Brummer et al., 2002). Elas são sintetizadas na forma de pró-enzimas ou zimógenos. As enzimas são mantidas em um estado inativo pela interação entre o grupo tiol da cisteína presente no pro-domínio e o íon zinco presente no sítio catalítico (Ra & Parks, 2007) e secretadas ou expostas na superfície celular para serem processadas e ativadas através do rompimento da interação entre o tiol do pró-domínio da MMP e o íon zinco da porção catalítica por oxidação do tiol, ativando o sítio catalítico das mesmas (Fu et al., 2001).

In vitro, algumas proMMPs podem ser ativadas por espécies reativas de oxigênio, entretanto, in vivo esta indução ainda não foi descrita. A regulação da expressão e atividades destas enzimas pode ocorrer pela presença de prostaglandinas (Amano et al., 2009), por indução de citocinas e fatores de crescimento como interleucinas, interferons e TNF- α , fatores estes, comuns em processos inflamatórios, bem como em processos tumorais (Yan & Boyd, 2007).

As MMPs podem ser reguladas por seus inibidores: α -macroglobulina e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), além da proteína RECK que é conhecida por inibir MMPs-2, -9 e -14 (Oh et al., 2001). Em modelos animais, inibidores sintéticos das MMPs foram efetivos na prevenção do desenvolvimento e progressão do câncer nos estágios iniciais do mesmo, entretanto, foram pouco efetivas em tumores mais avançados (Murphy & Nagase, 2008).

De um modo geral, as metaloproteinases de matriz (MMPs) modulam processos biológicos como: formação óssea, angiogênese, migração celular e inflamação, incluindo o câncer (Bharat et al. 2006). Segundo Folgueras e colaboradores (2004), MMPs liberam fatores de crescimento que contribuem para o desenvolvimento do tumor, bem como inibem apoptose e degradam algumas citocinas, influenciando a resposta imune.

A degradação da lâmina basal e MEC (barreira física) é um processo imprescindível para invasão, migração, proliferação, angiogênese e metástase de células tumorais. Por este motivo, MMPs são enzimas super expressas e mais importantes envolvidas nos primeiros estágios da tumorigênese e do crescimento do tumor primário, caracterizado por intensa proteólise (Stack & Munshi, 2006). O aumento da expressão e atividade das MMPs tem sido associada com um pior prognóstico dos pacientes (Blázquez et al., 2008). *In vivo*, um aumento da expressão e atividade das MMP-2 e -9 foram correlacionadas com um aumento do grau de malignidade dos gliomas (Nakagawa et al., 1996). Além disso, Kondraganti et al. (2000) mostrou que a supressão da expressão da MMP-9 reduziu a invasividade das células de glioblastoma.

Para conter o processo de invasão de tumores, o gene supressor de tumor, *RECK*, tem sido exaustivamente estudado. RECK está presente em diversos tecidos normais, entretanto, sua expressão é diminuída ou reprimida durante a transformação celular, enquanto, a secreção e atividade das MMPs encontram-se aumentadas, contribuindo para o comportamento invasivo do tumor (Takahashi, 1998). O gene RECK inibe a atividade das MMPs por codificar uma glicoproteína de membrana que tem alvos na região pericelular, local de elevada atividade proteolítica (Liotta & Kohn, 2001; Wang et al. 2002).

Já é conhecido que RECK regula negativamente as MMP-2 e MMP-9 (Oh et al., 2001). Portanto, a expressão de RECK está relacionada a contenção da invasão e metástase e sua inibição permitiria atividade excessiva das MMPs, promovendo invasão, metástase e angiogênese (Noda et al., 2003). Correa et al. (2006) sugeriu RECK como um potente inibidor de MMP-2, -9, sendo a expressão de RECK inversamente correlacionada com a expressão de MMP-2 e -9. Além disso, a expressão destas metaloproteases encontra-se mais elevada nas células T98G se comparado às células A172, contribuindo possivelmente para o comportamento mais agressivo das células T98G. Noda & Takahashi (2007), descreveram que quanto maior a expressão e produção da proteína RECK em tumores, melhor é o prognóstico e maior a sobrevida dos pacientes. Em trabalho recente, Silveira Corrêa et al. (2009) mostrou que a superexpressão do gene RECK no glioma T98G exerceu pequeno efeito sobre a atividade das MMP-2 e -9, entretanto, RECK foi capaz de inibir o processo

invasivo dos gliomas por ser capaz de rearranjar o citoesqueleto celular e as adesões focais, contendo a capacidade migratória destas células.

As linhagens celulares de gliomas humanos, T98G (invasiva) e A172 (menos invasiva) apresentam diferenças pontuais. O caráter invasivo das células T98G está associado à elevada produção de enzimas do tipo MMP-2, maior crescimento, níveis mais baixos de TIMP e maior mobilidade se comparado à linhagem A172. As inúmeras pesquisas sobre o envolvimento das MMPs nos processos inflamatórios e tumorais e os fatores capazes de estimular a ativação das mesmas é de suma importância para pensarmos em agentes terapêuticos efetivos para o tratamento de gliomas. Neste caso, nosso objetivo consiste em entender se SAA é capaz de afetar a expressão do gene RECK e das MMP-2 e MMP-9, visto que é conhecido que SAA aumenta a produção de MMPs em células de fibroblastos sinoviais (Martel-Pelletier et al., 2001).

6 OBJETIVOS

Fatores sintetizados por células tumorais atuam de forma autócrina e/ou em células normais do hospedeiro, especialmente em células do sistema imune, contribuindo para o crescimento do tumor. Por este motivo, optamos por avaliar alguns dos compostos representantes das diferentes classes de substâncias que estão de alguma forma envolvidos na progressão do tumor, entre eles, as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8, a molécula mensageira NO, as metaloproteases, MMP2 e MMP9, e o gene regulador das MMPs, RECK. Ainda, analisamos IFN- γ como indutor *in situ* das diferentes isoformas da SAA e da proteína SAA. O efeito da SAA na formação ou expressão destes compostos foi avaliada em duas linhagens de glioma humano, A172 e T98G. Além disso, também constitui um objetivo deste estudo entender se SAA é capaz de desempenhar algum papel na proliferação, migração e invasão de células tumorais. A partir do conhecimento gerado espera-se compreender melhor a relação entre inflamação/SAA/tumor.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Condições de Cultura e Manutenção das linhagens

As linhagens celulares A172 e T98G (ATCC # CRL 1690) originadas de glioblastoma multiforme humano com propriedade aderente e morfologia semelhante a fibroblastos foram doadas pela Profa Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), com baixa concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 50UI/mL penicilina e 50µg/mL de estreptomicina, incubadas em garrafas de plástico de 75cm³ em estufa a 37°C, e atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade controlada de 98%.

As células foram repicadas sempre que atingiram 80% da densidade de saturação, utilizando tripsina a 0,1% em PBSA (tampão fosfato livre de cálcio e magnésio), contendo 1mL de EDTA, tendo sido a cultura previamente lavada com solução de PBSA.

7.2 Avaliação da viabilidade e crescimento das linhagens de glioma

As duas linhagens celulares, A172 e T98G foram cultivadas em placas de 24wells na proporção de 1x10⁴ células/mL e 1x10⁵ células/mL/poço. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ em DMEM suplementado com 0,5% e 10% de SFB. As células suplementadas com meio DMEM 10% foram estimuladas com IFN-γ na concentração de 100ng/mL por 48horas e com SAA nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL e 20µg/mL por três, cinco e sete dias. As células carenciadas com meio DMEM a 0,5% de SFB foram estimuladas com 1µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL por dois, cinco e sete dias. Após o tempo de tratamento, as linhagens foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer com o corante azul de trypan (0,1% em tampão fosfato, PBS) para avaliar a viabilidade celular e seu crescimento. As células analisadas por microscopia óptica que apresentaram

em seu interior coloração azul foram consideradas não viáveis, sendo que aquelas que não incorporaram azul de trypan foram consideradas saudáveis (Freshney, 1987). Utilizamos o programa Origin 5.0 para os cálculos das médias, desvio padrão e confecção dos gráficos.

7.3 ELISA

As determinações de TNF- α , IL-8 e IL-6 foram feitas através de placas de ELISA de poliestireno da marca Corning (cód. 2592), as quais foram montadas e padronizadas a partir do kit Duoset da R&D System Minneapolis, MN, USA. Os anticorpos das diferentes citocinas foram diluídos segundo as concentrações abaixo:

TNF- α

	Solução Estoque	Concentração de uso
Anticorpo de Captura	720 μ g/mL	4 μ g/mL
Anticorpo de Detecção	45000ng/mL	250ng/mL
Padrão	290ng/mL	1000pg/mL (inicial)

Limite de detecção: 15,62 pg/mL.

IL-8

	Solução Estoque	Concentração de uso
Anticorpo de Captura	720 μ g/mL	4 μ g/mL
Anticorpo de Detecção	3,6 μ g/mL	20ng/mL
Padrão	90ng/mL	2000pg/mL (inicial)

Limite de detecção: 31,25 pg/mL.

IL-6

	Solução Estoque	Concentração de uso
Anticorpo de Captura	360 μ g/mL	2 μ g/mL
Anticorpo de Detecção	36 μ g/mL	200ng/mL
Padrão	35ng/mL	600pg/mL

Limite de detecção: 9,4 pg/mL

7.3.1 Preparo da placa

1. O anticorpo de captura foi diluído em PBS, na concentração final

desejada. Foram colocados 100µL de anticorpo diluído em cada poço e a placa foi deixada em local escuro a temperatura ambiente over-night.

2. Após o período de sensibilização, os poços foram aspirados e lavados com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4) por três vezes.
3. Os poços foram bloqueados adicionando 300µL de tampão de bloqueio (1% de BSA, 5% de sucrose, 0,05% de NaN₃ em PBS), durante 1 hora.

7.3.2 Procedimento de dosagem

1. Os padrões foram diluídos em reagente diluente (0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão tris-salina, pH 7.4).
2. Foram pipetados 100µL de amostra e padrão por poço e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Após o término do tempo de incubação os poços foram lavados como descrito anteriormente.
4. Em seguida foram adicionados 100µL de anticorpo de detecção diluído em tampão diluente em cada poço e incubado, novamente, por duas horas a temperatura ambiente.
5. As aspirações e lavagens do passo 2 da preparação foram repetidas.
6. Foram adicionados 100µL de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 no reagente diluente), e a placa foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta.
7. As aspirações e lavagens do passo 2 da preparação foram repetidas.
8. Foram adicionados 100µL de solução substrato em cada poço e a placa foi incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo o reagente colorido A (H₂O₂) e o reagente colorido B (tetrametilbenzadina) na proporção 1:1.
9. Para terminar a reação foram adicionados 50µL da solução *stop* (H₂SO₄ 2N) em cada poço e homogeneizado.
10. A densidade óptica dos poços foi determinada imediatamente a 450/550 nm.
11. Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos de concentrações conhecidas.

7.4 Determinação de produtos do Óxido Nítrico

As linhagens T98G e A172 foram carenciadas com meio contendo 0,5% de SFB e após este período foram estimuladas com SAA na concentração desejada e mantidas em atmosfera rica em CO₂ durante 24hs. Ao final da incubação o sobrenadante foi recolhido para posterior determinação de NO pelo analisador de quimiluminescência (NOATM, Sievers).

Níveis de NO foram medidos na fase gasosa pelo Analisador de Óxido Nítrico. 60µL das amostras de sobrenadante das culturas celulares foram injetadas dentro de um sistema contendo solução de 1% de iodeto de sódio em ácido acético glacial para liberar NO gasoso e nitrito. As amostras gasosas foram expostas ao ozônio para formar dióxido de nitrogênio ativado (NO⁺), o qual foi detectado por um tubo fotomultiplicador. Para cada amostra, a área sob a curva foi convertida em µM de nitrito com base em curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (Feelisch et al., 2002). O limite de detecção do método foi de 0,5 µM de NO.

7.5 Expressão Gênica

7.5.1 Extração de RNA Total

As linhagens T98G e A172 foram cultivadas em DMEM 10% de FBS, estimuladas separadamente com 5µg/mL e 20µg/mL de SAA (1x10⁵ células/mL em placa de 24wells) e 100ng/mL de IFN-γ (1x10⁵ células/mL em placa de 35mm) por 48hs e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o término da cultura os RNAs foram extraídos com o kit RNeasy® Mini Kit da Qiagen, conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os “pellets” de RNA foram ressuspensos em 40µL de água livre de DNase/RNase, quantificados pelo NanoDrop ND e estocados à -80°C até o momento da análise por RT-PCR. Para verificação da qualidade dos RNAs extraídos foi feito eletroforese em gel de agarose.

7.5.2 Qualidade dos RNAs

Os RNAs extraídos das culturas celulares estimuladas com e sem SAA e com e sem IFN- γ foram quantificados no NanoDrop ND-1000. A pureza e qualidade dos RNAs foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e pela razão de absorbância 260/280nm. Isto porque ácidos nucleicos possuem pico de absorbância de UV a 260nm e proteínas possuem absorção a 280nm, portanto uma amostra contaminada com proteína demonstra absorção de raios UV nesse comprimento de onda. Neste estudo, a razão de absorbância ficou dentro do esperado, com valores entre 1,6 a 2,0 em pH neutro.

7.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time – PCR)

7.5.3.1 Preparação dos cDNAs

Os cDNAs foram obtidos através do kit SuperScript™ First-Strand da Invitrogen, conforme protocolo descrito pelo fabricante. 10ng das amostras de RNAs extraídas foram incubadas com 1U de DNaseI (Fermentas) durante 10 minutos a 37°C para degradação de qualquer DNA contaminante. Em seguida foi realizada transcrição reversa utilizando oligo-DT (500 μ g/ μ L). A enzima utilizada foi a SuperScript II (200U/ μ L), além de RNase OUT para evitar a degradação do RNA. Ao final da transcrição reversa foi adicionado RNase H (5U/ μ L) para degradar a contaminação com RNA. Os cDNAs foram armazenados em freezer -20°C e diluídos com água livre de DNase/RNase.

7.5.4 q-PCR para quantificação de expressão relativa

O ensaio de Real Time PCR foi realizado para quantificarmos a diferença de expressão de mRNA da SAA1, SAA2, SAA4 na presença e ausência de IFN- γ e SAA e dos genes MMP-2, MMP-9 e RECK na presença e ausência de SAA nos gliomas. As reações foram feitas para um volume final de 12 μ L, contendo 3 μ L da mistura de um dos pares de *primers* concentração *Forward* e *Reverse* de cada gene, 3 μ L de cDNA e 6 μ L de SYBR Green Master

Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Foram utilizados *primers* dos genes de interesse, SAA1, SAA2, SAA4 (seqüência desenhada conforme Blast da NCBI), MMP-2, MMP-9, RECK e como controle interno Tubulina (Correa et al. 2006). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se na **tabela 1**.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

	Forward	Reverse
<i>hSAA1</i>	5'CCTGGGCTGCAGAAGTGATCAGCGA 3'	5'AGTCCTCCGCACCATGGCCAAAGAA 3'
<i>hSAA2</i>	5'CTGGGCCGCGAGAAGTGATCAGCA 3'	5'GAGTCCTCCGCACCATGGCCTGT 3'
<i>hSAA4</i>	5'GTTTCGTTTTTCAAGGAGGCTCTCCAA 3'	5'GGATATCATTATGTCCCAATAGGCTCT3'
<i>hMMP2</i>	5'GACTACGACCGCGACAAGA3'	5'TGTTGCCCGAGGAAAGTGAA3'
<i>hMMP9</i>	5'GAGGTGGACCGGATGTTCC3'	5'AACTCACGCGCCAGTAGAAG3'
<i>hTubulina</i>	5'TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG3'	5'AGTGCCAGTGCGAACTTCATC3'
<i>hReck</i>	5'TGCAAGCAGGCATCTTCAAA3'	5'ACCGAGCCCATTTCATTCTG3'

O ensaio de Real Time PCR foi realizado no equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, New Jersey, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C para o término do processo de desnaturação e por fim anelamento e alongação dos *primers* a 60 °C por 1 minuto. A quantificação das amostras foram realizadas usando tubulina como controle.

Para padronização do ensaio de PCR em tempo real, primeiramente foi estipulada qual a melhor diluição de template para tais reações com as linhagens celulares de glioma humano, T98G e A172. Para isso foram feitos “*pools*” de quantidades equivalentes de cada um dos cDNAs obtidos e foram testadas várias diluições deste “*pool*” (1:30, 1:60, 1:120, 1:150, 1:500, 1:1.000, 1:2.500, 1:5000 e 1:10.000) com três diferentes concentrações de *primers* (400nM, 600nM e 800nM) de todos genes de interesse. A concentração de 600nM foi a mais específica para os primers dos genes em estudo e por este motivo os experimentos foram realizados nesta concentração. Adotamos para uso, a diluição de cDNA 1:30 para os genes SAA4 e MMP-9 e 1:60 para os genes SAA1, SAA2, MMP-2 e RECK.

Para análise da expressão gênica através de Real-Time PCR foi utilizado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta C_t$). Para utilizarmos o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$, foi necessário comparar a eficiência de amplificação dos genes. Os valores de C_T do gene alvo foram subtraídos dos valores de C_T do gene controle. Foi feito um gráfico da diferença contra o logaritmo da diluição de cDNA. Se a inclinação da reta (*slope*) for menor que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, justificando-se assim a utilização deste método de análise de expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001).

7.6 Determinação da proteína SAA

1×10^5 e 5×10^5 células/mL das linhagens A172 e T98G foram cultivadas em placa de petri de 35mm (Corning Incorporated, NY, USA) em meio DMEM 10% SFB, estimuladas com 100ng/mL de IFN- γ e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 48h de cultura, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos, lisadas com Tween 0,05%, sonicadas e centrifugadas a 2500rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi analisado com o kit Human SAA ELISA (Invitrogen, USA) para quantificação da proteína SAA. O programa Origin 5.0 foi usado para o cálculo das médias, desvio padrão e confecção dos gráficos.

7.7 Proliferação Celular por [³H]Timidina

Foram plaqueadas 1×10^4 células em placas de 96 poços em 200 μ L de DMEM a 10% SFB. Quando as células atingiram 70% de confluência, foram lavadas com PBSA e carenciadas com DMEM a 0,5% SFB por 48hs. Então as células foram estimuladas com 0,1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 5 μ g/mL e 20 μ g/mL de SAA por 48hs. A adição total de 1 μ L de [³H-metil]-timidina (concentração final de 1 μ Ci/mL) e timidina fria (10^{-7} M) por poço foi realizado 18 horas antes de completar as 48 horas de estímulo com SAA. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x gelado. As células foram fixadas com 100 μ L/poço de ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado por 15 minutos e o excesso foi retirado, lavando com PBS. As células foram lisadas com 20 μ L/poço de NaOH 0,5M (aquecido a 62°C) e incubação de 20minutos na

estufa. Posteriormente, os papéis filtros (1,0 - 0,5cm) foram introduzidos nos poços da placa por 20 minutos. Os filtros foram lavados com TCA 5%, em seguida com etanol 70% e por último com acetona. Os filtros foram secos em estufa 40°C por 2 horas. Os filtros secos foram colocados em frascos de cintilação (PPO 4g; POPOP 0,1g e tolueno 1L). A contagem de radiação foi feita em aparelho cintilador.

7.8 Migração celular

Foram plaqueadas 1×10^5 células em placa de 24 poços em 500µL de DMEM a 10% de SFB. Após 24hs as células atingiram confluência e uma linha vertical central (ferida) foi aberta com a ponta de uma ponteira de 200µL e os debris lavados com PBSA para serem removidos. As células foram tratadas com 20µg/mL de SAA em meio DMEM a 0,5% SFB, incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. A migração das células na presença de SAA foi comparada a migração das células controle. Imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.0 zoom óptico em diferentes tempos da migração celular. A quantificação da migração foi realizada com o programa Axio Vision Release 4.8.

7.9 Invasão celular *in vitro*

Câmaras de Boyden (8µm, BD) foram colocadas em poços de placas de 24wells. Polimerizou-se matrigel (BD) diluído 1:6 em DMEM sem soro sobre a membrana da câmara. As células A172 e T98G (1×10^5 células/mL) foram plaqueadas no compartimento interno da câmara em uma suspensão de 200µL de DMEM a 0,5% de SFB na presença e ausência de 20µg/mL de SAA. 300µL de DMEM a 0,5% de SFB na presença e ausência de SAA foram adicionados no compartimento externo à câmara de Boyden.

Após 24h as células que migraram através do matrigel foram fixadas com glutaraldeído 5% diluído em PBS, lavadas 3x com água destilada e então coradas com solução de azul de toluidina a 2%. Após nova lavagem com água destilada para retirada do excesso de corante, o compartimento interno da câmara foi limpo com hastes de algodão. As células que invadiram foram

contadas sob microscopia de luz. Três experimentos foram realizados em duplicata de poços e todos os campos foram contados.

7.10 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do teste de comparação One-way ANOVA pelo Student–Newman–Keuls. O programa Origin 5.0 foi utilizado para o cálculo das médias, desvio padrão e confecção dos gráficos.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Efeito da SAA sobre a produção de citocinas

Baseados nos fatos: (i) a transcrição do gene da SAA ser induzida por TNF- α via IL-6, (Burger e Dayer, 2002), (ii) estas citocinas induzirem a síntese de SAA, (iii) estas citocinas, além da IL-8, apresentarem efeitos pleiotrópicos em tumores e estarem relacionados à progressão do tumor; achamos relevante quantificá-las no sobrenadante do cultivo celular por ELISA.

As linhagens A172 e T98G respondem de forma diferente ao tratamento com SAA no que diz respeito à produção de IL-8. A linhagem A172 não produziu IL-8 em condição não estimulada, entretanto, na presença de SAA secretou quantidade significativa de IL-8, sendo esta produção dose dependente para SAA (**Figura 2**). Quando A172 foi estimulada com 5 μ g/mL de SAA por 48 horas, a quantidade de IL-8 produzida foi comparável a secretada por monócitos e neutrófilos. Sabemos que monócitos (1.5 $\times 10^6$ células/mL) e neutrófilos (2.5 $\times 10^6$ células/mL) produzem respectivamente 70ng/mL e 50ng/mL de IL-8 na presença de 17 μ g/mL de SAA (Hatanaka et al., 2007).

SAA não estimulou a produção da citocina IL-8 na linhagem T98G (**Figura 2**), entretanto, foi observada uma produção expressiva da mesma, independente de estímulo (comparável com a quantidade produzida pela A172 quando estimulada com 5 μ g/mL de SAA). Esta produção espontânea de IL-8 pela linhagem T98G pode estar relacionada à manutenção de seu fenótipo mais invasivo se comparado a linhagem A172.

A análise da produção das citocinas TNF- α e IL-6 no sobrenadante dos gliomas após 48 horas de estímulo com diferentes concentrações de SAA não foi detectável nas condições testadas.

Figura 2: produção de IL-8 pelos gliomas na presença e ausência da SAA. SAA estimula a produção de IL-8 na linhagem A172, mas não estimula de forma significativa a produção de IL-8 na linhagem T98G. 1×10^4 células/mL foram estimuladas com diferentes concentrações de SAA em DMEM a 10% de SFB e mantidas em cultura por 48 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

8.2 SAA induziu produção de óxido nítrico

Nosso grupo de pesquisa já descreveu que SAA é capaz de induzir expressão de iNOS e óxido nítrico em macrófagos (Sandri et al., 2008). Nesta pesquisa, nós observamos que SAA foi capaz de desencadear a produção de NO de maneira dose dependente nas células A172 após 72 horas na presença de SAA (**Figura 3A**). Já as células T98G responderam produzindo óxido nítrico apenas em concentrações baixas de SAA (**Figura 3B**).

Estes resultados obtidos com gliomas, apesar de terem apresentado uma magnitude de produção de NO menor que a obtida por nosso grupo com macrófagos de peritônio de camundongo (basal aproximadamente de $5 \mu\text{M}$ de NO, enquanto o tratamento com $10 \mu\text{g/mL}$ de SAA por 48hs induziu a produção

de aproximadamente 40 μ M de NO) (Sandri et al., 2008), o efeito dose dependente para SAA foi o mesmo evidenciado na linhagem A172. Entretanto, macrófagos não foram capazes de responder a concentrações menores que 0,5 μ g/mL de SAA, enquanto as células A172 e T98G responderam até mesmo a concentração de 0,1 μ g/mL de SAA.

Figura 3: SAA estimula a produção de NO na linhagem A172 (A) e T98G (B). 1×10^4 células/mL foram estimuladas com diferentes concentrações de SAA em DMEM a 10% de SFB e mantidas em cultura por 72 horas. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ vs controle.

8.3 Expressão de SAA, MMPs e RECK nos gliomas A172 e T98G

Inicialmente foi feita a validação do método de análise descrito por Livak & Schmittgen (2001). A partir dos dados de amplificação das diluições seriadas dos pools de amostra, foi calculado o Delta Ct de cada gene de interesse (SAA1, SAA2, SAA4, MMP-2, MMP-9 e RECK) em relação ao gene constitutivo *Tubulina*. O Delta Ct foi utilizado para construir um gráfico contra o logaritmo da diluição de cDNA, e calculada a regressão linear destas curvas. Se a inclinação da reta (slope) for menor que 0,1 a eficiência de amplificação do controle interno e do gene de interesse são comparáveis, podendo assim utilizar este método para avaliação das expressões gênicas dos genes em questão.

Pode-se observar que fica validada a utilização do método do Delta Delta Ct para análise de expressão gênica de todos os genes de interesse, uma vez que as inclinações das retas são menores do que 0,1 (**Tabela 2**), mostrando que a eficiência de amplificação dos genes alvos é semelhante à eficiência de transcrição do controle interno (*tubulina*). Além disso, o valor de

R^2 foi próximo a 1 (R^2 entre 0,97 e 0,99), mostrando também correlação positiva entre as variáveis, ou seja, entre os genes de interesse e o constitutivo *Tubulina* (**Figura 4**).

Tabela 2: Valor do slope dos diferentes genes para validação experimental pelo método de Delta-Delta Ct (Livak & Schmittgen, 2001) para os genes do estudo. Notar todos os valores de slope ou inclinação da reta, inferiores a 0,1.

Gene	Validação (slope < 0,1)
SAA1	- 0,058
SAA2	0,035
SAA4	- 0,020
MMP-2	- 0,062
MMP-9	- 0,017
RECK	0,092

Figura 4: eficiência de amplificação dos genes MMP-2 (A), MMP-9 (B) e RECK (C), SAA4 (D), SAA1(E) e SAA2 (F) em relação ao gene endógeno Tubulina. Diluições seriadas de cDNA foram amplificadas por RT-PCR quantitativo usando primers específicos. Os dados foram ajustados usando análise de regressão linear. Notar os valores de R^2 próximo a 1 para inclinação da reta.

Na **Figura 5** verificamos a expressão gênica constitutiva dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 nas linhagens de glioma humano A172 e T98G. A linhagem A172 apresentou expressão aumentada para todas as isoformas da SAA se comparado a linhagem T98G. Entretanto, em ambas linhagens, a isoforma SAA1 é constitutivamente mais expressa, a SAA2 é a segunda mais expressa e o gene SAA4 é o menos expresso (**Figura 5**). Portanto, o perfil de

expressão predominante dos genes para SAA é o mesmo em ambas linhagens.

Figura 5: Expressão gênica quantitativa comparativa dos genes SAA1, SAA2 e SAA4. As linhagens permaneceram em DMEM 10% de SFB por 48 horas, após o RNA foi extraído e convertido a cDNA para realização do Real Time PCR. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Quanto a expressão constitutiva de genes relacionados à progressão tumoral, reproduzimos dados de Correa et al. (2006) observando que em ambas linhagens o gene MMP-2 é o mais expresso. Estes dados corroboram com a classificação da T98G como mais invasiva que A172, uma vez que T98G apresentou expressão maior de MMP-2 e MMP-9 e menor de RECK se comparado a A172 (**Figura 6**).

Figura 6: Expressão gênica quantitativa comparativa entre os genes MMP-2, MMP-9 e RECK. As células foram cultivadas em DMEM com 10% de SFB por 48 horas, após o RNA foi extraído e convertido a cDNA para realização do Real Time PCR. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

8.4 SAA afetou a expressão dos genes MMP-2, MMP-9 e RECK

SAA foi capaz de induzir a expressão de genes importantes relacionados à invasão tumoral. Embora os efeitos do tratamento dos gliomas com SAA nas concentrações de 5µg/mL e 20µg/mL não tenha obedecido uma linearidade, foi possível observar um predomínio no aumento da expressão dos genes MMP-2 e MMP-9 em ambas linhagens de glioma estudadas e diminuição da expressão do gene supressor de tumor, RECK, reproduzindo um padrão tumoral, em que RECK aparece com expressão inversa a das MMPs (**Figura 7**). Neste caso, estes resultados podem sugerir que SAA é capaz de afetar o remodelamento da MEC e estimular a invasão tumoral.

Figura 7: Expressão gênica quantitativa dos genes MMP-2, MMP-9 e RECK na linhagem A172 e T98G na presença e ausência da SAA. As linhagens foram incubadas com 5µg/mL e 20µg/mL de SAA e mantidas em cultura durante 48 horas, após o RNA foi extraído e convertido a cDNA para realização do Real Time PCR. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 vs controle.

8.5 SAA induziu proliferação celular

Posteriormente, verificamos o crescimento das duas linhagens celulares na presença da SAA em meio DMEM a 0,5 e 10% de SFB. Os resultados indicam que as linhagens T98G e A172 possuem crescimento prolífico em meio DMEM contendo 10% de SFB. Nesta condição, a adição de SAA ao meio provoca um duplo efeito sobre a proliferação. Em um período curto de três dias,

SAA inibiu a proliferação celular. Este efeito é muito claro, especialmente para T98G que mostra uma inibição em todas as concentrações testadas para SAA.

No quinto dia da cinética de crescimento em meio DMEM com 10% de SFB, a linhagem A172 apresentou crescimento significativo apenas quando tratada com 1µg/mL de SAA, enquanto T98G mostrou inibição para todas as concentrações utilizadas de SAA. Para ambas linhagens carenciadas com meio DMEM a 0,5% de SFB foi possível observar um perfil dose dependente, entretanto o crescimento foi significativo apenas quando A172 foi estimulada com 10µg/mL de SAA e T98G para as concentrações de 5µg/mL e 10µg/mL se comparado ao controle

Já no sétimo dia, a cinética de crescimento mostra a proliferação de ambas as linhagens em todas as concentrações utilizadas (**Figura 8**). Quando as células foram carenciadas com meio DMEM 0,5% de soro humano, o crescimento das duas linhagens foram comprometidas, no entanto, o efeito dose dependente da SAA foi perceptível na curva de proliferação.

A172 10%

A172 0.5%

Figura 8: Cinética de crescimento das linhagens A172 e T98G em diferentes condições: meio DMEM enriquecido com 10% de SFB e meio DMEM deficiente em SFB (0,5%) na ausência e presença de SAA (0,1µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL). As células cultivadas em DMEM com 0,5% de SFB foram contadas nos dias 2, 5 e 7, enquanto as células cultivadas em DMEM com 10% de SFB foram contadas nos dias 3, 5 e 7. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Estes resultados indicam que o meio DMEM a 10% de SFB por ser rico em fatores de crescimento pode mascarar o efeito da proteína SAA, e neste caso, o meio DMEM a 0,5% de SFB foi o mais indicado para os diferentes ensaios realizados com SAA. Além disso, a viabilidade celular medida pela exclusão por azul de trypan (99%) das linhagens de glioma na presença e ausência de SAA foi ótima tanto para DMEM a 0,5% de SFB, quanto para DMEM a 10% de SFB.

A avaliação da suplementação com diferentes quantidades de soro fetal bovino é importante, pois tem sido observado por nosso grupo de pesquisa que a adição de HDL inibe a atividade da SAA sobre a liberação de citocinas por células THP-1 (células monocíticas de leucemia aguda) e por monócitos humanos (Franco AG, comunicação pessoal). Sabe-se que SAA encontra-se

associada à HDL no soro e tem-se sugerido que esta associação poderia prover uma forma de transporte da SAA na forma “inerte” através do compartimento circulatório, prevenindo uma inflamação descontrolada. No tecido, haveria a dissociação da SAA e promoção da liberação de citocinas.

Para eliminar possível interferência do soro a 10% de SFB (rico em fatores de crescimento) foi realizado ensaio com [^3H]-timidina para as linhagens de glioma em DMEM com 0,5% de SFB. Os resultados com meio DMEM a 0,5% de SFB comprovaram o efeito proliferativo de SAA, sendo que na linhagem T98G, este efeito foi dose dependente (**Figura 9**). A proliferação celular da linhagem A172 foi induzida pela SAA em uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ de SAA não mostrou efeito sobre a proliferação de A172 (**Figura 9**). De qualquer forma ficou evidente que a relação efeito na proliferação *versus* concentração de SAA pode ser totalmente diferente dependendo da linhagem tumoral.

Figura 9: proliferação celular induzida por SAA nas linhagens de glioma. $1,0 \times 10^4$ células/mL foram estimuladas com SAA por 48 horas sob diferentes concentrações, após atingirem 70% de confluência em meio DMEM a 10% de SFB e sincronização por 48 horas em DMEM a 0,5% de SFB. A proliferação foi determinada por incorporação de [^3H] timidina 18 horas antes de completar 48hs de tratamento com SAA. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

8.6 SAA afetou migração celular

Os resultados obtidos para o *scratch test* mostraram que SAA afeta a mobilidade celular dos gliomas. A linhagem A172 estimulada com 20 μ g/mL de SAA por 24 horas teve aproximadamente 20% de sua migração inibida se comparado ao controle (**Figura 10A e B**). Já a linhagem T98G estimulada com 20 μ g/mL de SAA por 24 horas teve sua migração aumentada em aproximadamente 50% se comparado ao controle sem SAA (**Figura 10C e D**). A utilização da concentração de 20 μ g/mL de SAA justifica a intenção de reproduzir *in vitro* processos inflamatórios em que os níveis de SAA ultrapassam a concentração de 10 μ g/mL de SAA no plasma humano.

Figura 10: SAA afeta a motilidade das células de glioma. As linhagens A172 e T98G (1×10^5 células/mL) foram mantidas em cultura por 24 h, uma “ferida” central foi aberta após confluência celular. As células foram mantidas em DMEM com 0.5% de FBS na ausência (A e C) e na presença de $20 \mu\text{g/mL}$ de SAA (B e D). Depois de 24 h a migração foi estimada. As imagens foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.0 de zoom óptico. As imagens são representativas de três experimentos independentes. A quantificação da área migrada pelas linhagens A172 e T98G na ausência e presença de SAA (E) foi realizada através do programa Axio Vision Release 4.8. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

8.7 SAA afetou invasão celular

A capacidade das células de glioma invadir uma matriz bi-dimensional foi avaliada por Matrigel®. Foi possível observar que as células A172 apresentaram uma inibição de mobilidade de aproximadamente 5 vezes na presença de $20 \mu\text{g/mL}$ de SAA (Figura 11A e B). Por outro lado, as células T98G tiveram sua capacidade invasiva aumentada em 4 vezes se comparado ao controle após 24 h na presença de $20 \mu\text{g/mL}$ de SAA (Figura 11C e D). Os resultados obtidos para SAA neste ensaio foram similares aos obtidos por *scratch test*, em que o efeito foi dependente do tipo celular, ou seja, na linhagem A172 a SAA parece exercer um efeito anti-neoplásico, enquanto em T98G a SAA parece ser pró-neoplásica.

Figura 11: SAA inibe a invasão da A172 (A e B) e é um quimioatraente para T98G (C e D). 1×10^5 células/mL foram colocadas em cima do matrigel® em câmara de Boyden e

20µg/mL foi adicionada embaixo do transwell. Depois de 24 h, as células que invadiram o matrigel® foram fixadas e contadas em microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x e 3.0 de zoom óptico. As imagens são representativas de três experimentos independentes. O gráfico representa a quantificação do número total de células que atravessaram o matrigel® e a membrana até a região externa da câmara na ausência e presença de SAA (E). Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

8.8 As diferentes isoformas da SAA foram induzidas por IFN- γ

SAA é expressa no fígado durante a resposta de fase aguda. Indutores conhecidos para SAA são IFN- γ , TNF- α e IL-6 (Bruun, Sletten and Marhaug, 1998; Urieli-Shoval et al., 2000). Por este motivo, testamos a possibilidade das células de glioma terem sua expressão afetada em resposta ao IFN- γ . Os resultados indicaram um aumento na expressão de mRNA para as três isoformas da SAA quando comparadas com o controle. Na linhagem A172, as isoformas mais expressas foram SAA 1 e SAA 4 (Figura 12), enquanto na T98G foi a SAA 1 e SAA 2 na presença do IFN- γ (Figura 13).

Figura 12: Expressão gênica quantitativa das diferentes isoformas de SAA na linhagem celular A172 e T98G. As linhagens foram incubadas com IFN- γ (100ng/mL) e mantidas em cultura durante 48 horas, após o RNA foi extraído e convertido a cDNA para realização do Real Time PCR. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 13: Expressão gênica quantitativa das diferentes isoformas de SAA na linhagem celular T98G. As linhagens foram incubadas com IFN- γ (100ng/mL) e

*mantidas em cultura durante 48 horas, após o RNA foi extraído e convertido a cDNA para realização do Real Time PCR. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.*

8.9 SAA é produzida pelos gliomas e sua produção é aumentada por IFN- γ

A expressão constitutiva das diferentes isoformas da proteína SAA nos gliomas e o aumento da expressão das diferentes isoformas da SAA pelo indutor IFN- γ nos levou a acreditar que os mesmos poderiam ser capazes de produzir a proteína SAA *in situ* e que esta produção poderia ser aumentada por IFN- γ . Os resultados indicaram que ambas linhagens foram capazes de produzir SAA, sendo esta produção aumentada em resposta ao IFN- γ em ambas linhagens (**Figura 14**).

Apesar da linhagem A172 ter apresentado expressão aumentada das diferentes isoformas de SAA se comparado a linhagem T98G, ambas apresentaram produção de quantidade protéica similar das diferentes isoformas da SAA.

Figura 14: produção da proteína SAA induzida por IFN- γ pelas linhagens A172 e T98G. As linhagens foram incubadas com INF- γ (100ng/mL) e mantidas em cultura durante 48 horas, após as células foram lisadas, sonicadas, centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para quantificação por ELISA. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ vs controle.

9 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em conjunto (**Figura 15**) mostraram pela primeira vez expressão e produção de SAA pelas células dos gliomas A172 e T98G e efeito da SAA sobre a produção de citocinas, de NO, de genes invasivos, MMP-2, MMP-9 e do gene RECK. Nossos dados suportam o fato de que SAA não é uma proteína secretada apenas pelo fígado, mas também pelos gliomas A172 e T98G. Esta produção de SAA pela própria célula tumoral indica uma possível ação *intracrina* ou autócrina e poderia interferir com a evolução do tumor dependendo da concentração de SAA e do tipo celular.

O efeito mitogênico de SAA na linhagem T98G, juntamente com seu efeito sobre a migração e invasão celular e aumento da produção de NO que é um elemento potencializador do crescimento tumoral, nos leva a sugerir que SAA seja um fator metastático para linhagens celulares invasivas.

Em adição, IFN- γ , um indutor clássico da SAA hepática aumentou a expressão das diferentes isoformas de SAA, bem como sua produção pelas células de glioma. A importância destes achados na terapia de tumores com IFN deve ser considerada. Este estudo também traz a primeira evidência de que SAA afeta o ciclo celular, migração e invasividade.

Figura 15: Possíveis ações da SAA sobre tumores.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMANO, H.; ITO, Y.; SUZUKI, T.; KATO, S.; MATSUI, Y.; OGAWA, F.; MURATA, T.; SUGIMOTO, Y.; SENIOR, R.; KITASATO, H.; HAYASHI, I.; SATOH, Y.; NARUMIYA, S.; MAJIMA, M. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis. **Cancer Science**, v.100, n.12, p.2318-2324, 2009.
2. AMBS, S.; MERRIAM, W.G.; OGUNFUSIKA, M.O.; BENNETT, W.P.; ISHIBE, N.; HUSSAIN, S.P.; TZENG, E.E.; GELLER, D.A.; BILLIAR, T.R.; HARRIS, C.C. p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. **Nature Medicine**, v.4, p.1371–1376, 1998.
3. AMES, B.N.; GOLD, L.S. Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. **Science**, v.249, n.4972, p.970-971, 1990.
4. ANDRADE, M.; BARNHOLTZ, J.S.; AMOS, C.I.; ADATTO, P.; SPENCER, C.; BONDY, M.L. Segregation analysis of cancer in families of glioma patients. **Genetic Epidemiology**, v.20, n.2, p.258–270, 2001.
5. BADOLATO, R.; WANG, J.M.; MURPHY, W.J.; LLOYD, A.R.; MICHIEL, D.F.; BAUSSERMAN, L.L.; KELVIN, D.J.; OPPENHEIM, J.J. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.180, n.1, p.203-209, 1994.
6. BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, n.2, p.135–141, 2002.
7. BARANOVA, I.N.; VISHNYAKOVA, T.G.; BOCHAROV, A.V.; KURLANDER, R.; CHEN, Z.G.; KIMELMAN, M.L.; REMALEY, A.T.; CSAKO, G.; THOMAS, F.; EGGERMAN, T.L.; PATTERSON, A.P. Serum amyloid a binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII Analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.9, p.8031–8040, 2005.
8. BARBIN, A.; OHGAKI, H.; NAKAMURA, J.; KURRER, M.; KLEIHUES, P.; SWENBERG, J. Endogenous deoxyribonucleic acid (DNA) damage in human tissues: a comparison of ethenobases with aldehydic DNA lesions. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.12, p.1241–1247, 2003.
9. BECKER, E.L.; FOROUHAR, F.A.; GRUNNET, M.L.; BOULAY, F.; TARDIF, M.; BORMANN, B.J.; SODJA, D.; YE, R.D.; WOSKA, J.R.; MURPHY, P.M. Broad immunocytochemical localization of the

- formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. **Cell & Tissue Research**, v.292, n.1, p.129–135, 1998.
10. BÉNAUD, C.; DICKSON, R.B.; THOMPSON, E.W. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.50, n.2, p.97-116, 1998.
 11. BIRAN, H.; FRIEDMAN, N.; NEUMANN, L.; PRAS, M.; SHAINKIN-KESTENBAUM, R. Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. **Journal of Clinical Pathology**, v.39, p.794-797, 1986.
 12. BLÁZQUEZ, C.; SALAZAR, M.; CARRACEDO, A.; LORENTE, M.; EGIA, A.; GONZÁLEZ-FERÍA, L.; HARO, A.; VELASCO, G.; GUZMAN, M. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. **Cancer Research**, v.68, n.6, p.1945-1952, 2008.
 13. BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, p.907-916, 2001.
 14. BRETT, J.; SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; ZOU, Y.S.; WEIDMAN, E.; PINSKY, D.; NOWYGRÓD, R.; NEEPER, M.; PRZYSIECKI, C.; SHAW, A. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **American Journal of Pathology**, v.143, p.1699–1712, 1993.
 15. BRUMMER, O.; BOHMER, G.; HOLLWITZ, B.; FLEMMING, P.; PETRY, K.U.; KUHNLE, H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation: an immunohistochemical study. **Gynecologic Oncology**, v.84, n.2, p.222-227, 2002.
 16. BRUUN, C.F.; SLETTEN, K.; MARHAUG, G. Mouse serum amyloid A (SAA) proteins isolated by two-dimensional electrophoresis: characterization of isotypes and the effect of separate and combined administrations of cytokines, dexamethasone and lipopolysaccharide (LPS) on serum levels and isotype distribution. **Clinical and Experimental Immunology**, v.111, p.231-236, 1998.
 17. CAI, H.; SONG, C.; ENDOH, I.; GOYETTE, J.; JESSUP, W.; FREEDMAN, S.B.; MCNEIL, H.P.; GECZY, C.L. Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. **Journal of Immunology**, v.178, p.1852–1860, 2007.
 18. CORDES, N.; HANSMEIER, B.; BEINKE, C.; MEINEKE, V.; VAN BEUNINGEN, D. Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. **British Journal of Cancer**, v.89, n.11, p.2122-2132, 2003.
 19. CORREA, T.C.S.; BROHEM, C.A.; WINNISCHOFER, S.M.B.; CARDEAL, L.B.S.; SASAHARA, R.M.; TABOGA, S.R.; SOGAYAR, M.C.; MARIA-ENGLER, S.S. Downregulation of the RECK-tumor and

- metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.99, n.1, p.156-167, 2006.
20. DERMAGOS, A.O.; ARMELIN, H.A.; CURI, R.; CAMPA, A.; HATANAKA, E. SAA effect on fibroblasts ROS production and proliferation. 2010. [Submetido]
 21. ENEWOLD, L.; MECHANIC, E.L.; BOWMAN, D.E.; ZHENG, L.Y.; YU, Z.; TRIVERS, G.; ALBERG, J.A.; HARRIS, C.C. Serum concentrations of cytokines and lung cancer survival in African Americans and Caucasians. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.18, n.1, p.215-222, 2009.
 22. EVDOKIOU, A.; COWLED, P.A. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS1, in NIH3T3 fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v.240, n.2, p.359-367, 1998.
 23. FEDERICO, A.; MORGILLO, F.; TUCCILLO, C.; CIARDIELLO, F.; LOGUERCIO, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v.121, p.2381-2386, 2007.
 24. FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N.S.; JOURD'HEUIL, D.; KELM, M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO *in vivo*. **FASEB Journal**, v.16, n.13, p.1775-1785, 2002.
 25. FOLGUERAS, A.R.; PENDAS, A.M.; SANCHEZ, L.M.; LOPEZ-OTIN, C. Matrix metalloproteinases in câncer: from new functions to improved inhibition strategies. **International Journal of Developmental Biology**, v.48, n.5/6, sp.iss., p.411-424, 2004.
 26. FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. New York: Wiley-Liss, 1987. p.117.
 27. FU, X.; KASSIM, S.Y.; PARKS, W.C.; HEINECKE, J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7): a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.44, p.41279-41287, 2001.
 28. FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.521-534, 2006.
 29. FURLANETO, C.J.; CAMPA, A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α (interleukin-1b, and interleukin-8 by human blood neutrophil. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.268, p.405-408, 2000.
 30. FURLANETO, C.J.; RIBEIRO, F.P.; HATANAKA, E.; SOUZA, G.M.; CASSATELLA, M.A.; CAMPA, A. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. **Lipids**, v.37, n.9, p.925-928, 2000.

31. GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.340, p.448–454, 1999.
32. GUILLEVIN, R.; MENUET, C.; DUFFAU, H.; KUJAS, M.; CAPELLE, L.; AUBERT, A.; TAILLIBERT, S.; IDBAIH, A.; PALLUD, J.; DEMARCO, G.; COSTALAT, R.; HOANG-XUAN, K.; CHIRAS, J.; VALLÉ, J.N. Proton magnetic resonance spectroscopy predicts proliferative activity in diffuse low-grade gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v.87, n.2, p.181-187, 2008.
33. GUTFELD, O.; PRUS, D.; ACKERMAN, Z.; DISHON, S.; LINKE, R.P.; LEVIN, M.; URIELI-SHOVAL, S. Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.54, n.1, p.63–73, 2006.
34. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57–70, 2000. [Review].
35. HARADA, M.; HABATA, Y.; HOSOYA, M.; NISHI, K.; FUJII, R.; KOBAYASHI, M.; HINUMA, S. N-formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.324, n.1, p.255–261, 2004.
36. HATANAKA, E.; FURLANETO, C.J.; RIBEIRO, F.P.; SOUZA, G.M.; CAMPA, A. Serum amyloid A induced mRNA expression and release of TNF- α in human neutrophils. **Immunology Letters**, 91, n.1, p.33-37, 2004.
37. HATANAKA, E.; RIBEIRO, F.P.; CAMPA, A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.38, p.81-84, 2003.
38. HATANAKA, E.; MONTEAGUDO, P.T.; MARROCOS, M.S.; CAMPA, A. Interaction between serum amyloid A and leukocytes - a possible role in the progression of vascular complications in diabetes. **Immunology Letters**, v.108, n.2, p.160-166, 2007.
39. HOLLAND, E.C. Glioblastoma multiforme: the terminator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.12, p.6242-6244, 2000.
40. HONG, D.S.; ANGELO, L.S.; KURZROCK, R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. **Cancer**, v.110, n.9, p.1911-1928, 2007.
41. HOWARD, B.A.; WANG, M.Z.; CAMPA, M.J.; CORRO, C.; FITZGERALD, M.C.; PATZ, E.F. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser

- desorption/ionization-time of flight spectra analysis. **Proteomics**, v.3, p.1720–1724, 2003.
42. JACK, C.S.; ARBOUR, N.; MANUSOW, J.; MONTGRAIN, V.; BLAIN, M.; MCCREA, E.; SHAPIRO, A.; ANTEL, J.P. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. **Journal of Immunology**, v.175, n.7, p.4320–4330, 2005.
 43. JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2006. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.56, n.2, p.106–130, 2006.
 44. KISHIMOTO, T. Interleukin-6: from basic science to medicine: 40 years in immunology. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.1–21, 2005.
 45. KONDRAGANTI, S.; MOHANAM, S.; CHINTALA, S.K.; KIN, Y.; JASTI, S.L.; NIRMALA, C.; LAKKA, S.S.; ADACHI, Y.; KYRITSIS, A.P.; ALI-OSMAN, F.; SAWAYA, R.; FULLER, G.N.; RAO, J.S. Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. **Cancer Research**, v.60, p.6851–6855, 2000.
 46. KUMON, Y.; SIPE, J.D.; BRINCKERHOFF, C.E.; SCHREIBER, B.M. Regulation of extrahepatic apolipoprotein serum amyloid A (ApoSAA) gene expression by interleukin-1 alpha alone: synthesis and secretion of ApoSAA by cultured aortic smooth muscle cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.46, n.3, p.284–291, 1997.
 47. LE, Y.Y.; MURPHY, P.M.; WANG, J.M. Formyl-peptide receptors revisited. **Trends in Immunology**, v.23, p.541–548, 2002.
 48. LEE, H.Y.; KIM, M.K.; PARK, K.S.; BAE, Y.H.; YUN, J.; PARK, J.I.; KWAK, J.Y.; BAE, Y.S. Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.330, n.3, p.989–998, 2005.
 49. LEE, H.Y.; KIM, S.D.; SHIM, J.W.; LEE, S.Y.; LEE, H.; CHO, K.H.; YUN, J.; BAE, Y.S. Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes. **Journal of Immunology**, v.181, n.6, p.4332–4339, 2008.
 50. LIOTTA, L.A.; KOHN, E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v.411, n.6835, p.375–379, 2001.
 51. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. **Methods**, v.25, n.4, p.402–408, 2001.
 52. MADAN, M.; AMAR, S. Toll-like receptor-2 mediates diet and/or pathogen associated atherosclerosis: proteomic findings. **PLoS ONE**, v.3, n.9, art.E3204, 2008.

53. MAHER, E.A.; FURNARI, F.B.; BACHOO, R.M.; ROWITCH, D.H.; LOUIS, D.M.; CAVENEE, W.K.; DEPINHO, R.A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes & Development**, v.15, n.11, p.1311-1333, 2001.
54. MALLE, E.; SODIN-SEMRLB, S.; KOVACEVICA, A. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.9–26, 2009.
55. MARTEL-PELLETIER, J.; WELSCH, D.J.; PELLETIER, J.P. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. **Best Practice & Research, Clinical Rheumatology**, v.15, p.805–829, 2001.
56. MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.17, p.501–519, 2006.
57. MIGITA, K.; KAWABE, Y.; TOMINAGA, M.; ORIGUCHI, T.; AOYAGI, T.; EGUCHI, K. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. **Laboratory Investigation**, v.78, n.5, p.535-539, 1998.
58. MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v.29, n.5, p.290-308, 2008.
59. NAKAGAWA, T.; KUBOTA, T.; KABUTO, M.; FUJIMOTO, N.; OKADA, Y. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase=type IV collagenase¼gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. **Journal of Neuro-Oncology**, v.28, p.13–24, 1996.
60. NAVAS-ACIEN, A.; POLLAN, M.; GUSTAVSSON, P.; PLATO, N. Occupation, exposure to chemicals and risk of gliomas and meningiomas in Sweden. **American Journal of Industrial Medicine**, v.42, p.214–227, 2002.
61. NODA, M.; OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; KITAYAMA, H.; TAKAHASHI, C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signalling to extracellular matrix remodelling. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.22, n.2/3, p.167-175, 2003.
62. NODA, M.; TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. **Cancer Science**, v.98, n.11, p.1659-1665, 2007.
63. OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; MIZOGUCHI, A.; ADACHI, E.; SASAHARA, R.M.; NISHIMURA, S.; IMAMURA, Y.; KITAYAMA, H.; ALEXANDER, D.B.; IDE, C.; HORAN, T.P.; ARAKAWA, T.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, S.I.; 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, n.6, p.789-800, 2001.

64. POITOU, C.; VIGUERIE, N.; CANCELLO, R.; DE MATTEIS, R.; CINTI, S.; STICH, V.; COUSSIEU, C.; GAUTHIER, E.; COURTINE, M.; ZUCKER, J.D.; BARSH, G.S.; SARIS, W.; BRUNEVAL, P.; BASDEVANT, A.; LANGIN, D.; CLEMENT, K. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. **Diabetologia**, v.48, n.3, p.519-528, 2005.
65. PRECIADO-PATT, L.; HERSHKOVIZ, R.; FRIDKIN, M.; LIDER, O. Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoproteins and induces the adhesion of resting CD4⁺ T cells. **Journal of Immunology**, v.156, p.1189–1195, 1996.
66. RA, H.J.; PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology**, v.26, n.8, p.587-596, 2007.
67. RAO, J.S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nature Reviews Cancer**, v.3, n.7, p.489-501, 2003.
68. RIBEIRO, F.P.; FURLANETO, C.J.; HATANAKA, E.; RIBEIRO, W.B.; SOUZA, G.M.; CASSATELLA, M.A.; CAMPA, A. mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. **Mediators of Inflammation**, v.12, p.173-178, 2003.
69. RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; HENRIQUE, CATALANI, L.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. **Journal of Pineal Research**, v.34, p.69-74, 2003.
70. RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, n.2, p.267-285, 2005.
71. SANDRI, S.; HATANAKA, E.; FRANCO, A.G.; PEDROSA, A.M.; MONTEIRO, H.P.; CAMPA, A. Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways. **Immunology Letters**, v.121, n.1, p.22-26, 2008.
72. SANDRI, S.; RODRIGUEZ, D.; GOMES, E.; MONTEIRO, H.P.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? **Journal of Leukocyte Biology**, v.83, n.5, p.1174-1180, 2008.
73. SANES, J.R. Extracellular matrix molecules that influence neural development. **Annual Review of Neuroscience**, v.12, p.491-516, 1989.
74. SILVEIRA CORRÊA TC et al. Reck-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2009.
75. SODHI, A.; BISWAS, S.K. fmlp-induced *in vitro* nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v.71, p.262-270, 2001.
76. SU, S.B.; GONG, W.H.; GAO, J.L.; SHEN, W.P.; MURPHY, P.M.; OPPENHEIM, J.J.; WANG, J.M. A seven-transmembrane, G protein-

- coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.2, p.395–402, 1999.
77. TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.Q.; HORAN, T.P.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.; TAKAI, S.; SASAHARA, R.M.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B.J.; ARAKAWA, T.; NODA, M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.22, p.13221-13226, 1998.
 78. URIELI-SHOVAL, S.; LINKE, R.P.; MATZNER, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Current Opinion in Hematology**, v.7, n.1, p.64-69, 2000. [Review].
 79. VADAY, G.G.; LIDER, O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behaviour and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, n.2, p.149-159, 2000.
 80. XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.56, n.5, p.576-582, 1994.
 81. XIE, Q.W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.7, p.4705-4708, 1994.
 82. ZHOU, Y; BIAN, X; LE, Y; GONG, W.; HU, J.; ZHANG, X.; WANG, L.; IRIBARREN, P.; SALCEDO, R.; HOWARD, O.M.Z.; FARRAR, W.; WANG, J.M. Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, n.11, p.823–835, 2005.
 83. WALDER, K.; MCMILLAN, J.S.; TREVASKIS, J.; KERR, L.; DE SILVA, A.; SUNDERLAND, T.; GODDE, N.; GAO Y.; BISHARA, N.; WINDMILL, K.; TENNE-BROWN, J.; AUGERT, G.; ZIMMET, P.Z.; COLLIER, G.R. Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation? **Diabetes**, v.51, n.6, p.1859–1866, 2002.
 84. WANG, F.; HANSEN, R.K.; RADISKY, D.; YONEDA, T.; BARCELLOS-HOFF, M.H.; PETERSEN, O.W.; TURLEY, E.A.; BISSELL, M.J. Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. **Journal of the National Cancer Institute**, v.94, n.19, p.1494-503, 2002.
 85. WANG, M.; WANG, T.; LIU, S.; YOSHIDA, D.; TERAMOTO, A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. **Brain Tumor Pathology**, v.20, n.2, p.65-72, 2003.

86. WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, v.254, n.5035, p.1138-1146, 1991.
87. YAMADA, T.; WADA, A.; ITOH, K.; IGARI, J. Serum amyloid A secretion from monocytic leukaemia cell line THP-1 and cultured human peripheral monocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.52, n.1, p.7-12, 2000.
88. YAN, C.; BOYD, D.D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **Journal of Cellular Physiology**, v.211, n.1, p.19-26, 2007.
89. YAN, S.D.; CHEN, X.; FU, J.; CHEN, M.; ZHU, H.; ROHER, A.; SLATTERY, T.; ZHAO, L.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; MIGHELI, A.; NAWROTH, P.; STERN, D.; SCHMIDT, A. M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**, v.382, n.6593, p.685–691, 1996.
90. YAN, S.D.; ZHU, H.; ZHU, A.; GOLABEK, A.; DU, H.; ROHER, A.; YU, J.; SOTO, C.; SCHMIDT, A.M.; STERN, D.; KINDY, M. Receptor dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. **Nature Medicine**, v.6, p.643–651, 2000.