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

**Inibição da migração mediada pelo gene *RECK* em
modelo de glioma humano através de alterações no
citoesqueleto e adesão focal**

Raquel Brandão Haga

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador: Profa Dra Silvy Stuchi Maria Engler

São Paulo

2012

Raquel Brandão Haga

Inibição da migração mediada pelo gene *RECK* em modelo de glioma humano
através de alterações no citoesqueleto e adesão focal

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, 18 de Maio de 2012.

*Aos meus pais e minhas irmãs pelo amor
incondicional e apoio em todos os momentos
da minha vida*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tetsuo e Maria Cecília, por sempre estarem ao meu lado e por me fazerem acreditar que eu era capaz de tudo. Obrigada pelo amor e compreensão.

Às minhas irmãs, Eloísa e Beatriz. Companheiras de vida e de aprendizado.

À minha família, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando. Amo muito vocês.

À Professora Silvy Stuchi pelas palavras sábias e por todo o apoio. Obrigada por confiar em mim e por todo o ensinamento.

À Professora Silvia Berlanga pelos conselhos e sabedoria.

Aos companheiros de laboratório Manoela, Camila, Paula, Bianca, Renato, Guilherme, Fernanda, Kely, Diogo, Andréa, Glaucia, Thalita, Érika, Laura, Rebeca, Mari e Taissa pelo apoio nos momentos difíceis e pelas lembranças que farão parte de uma etapa importante da minha vida. Obrigada pelo auxílio na interpretação dos dados e pelas longas discussões de protocolo. Certo, Manu?

À Tatiana Côrrea por deixar de herança seu projeto e por toda a ajuda para que eu pudesse realizá-lo.

À Fernanda Leve e ao Professor José Andres Morgado Diaz pela realização dos ensaios de pulldown e pela oportunidade de visitar o laboratório.

Ao Professor Chiaki Takahashi e todos os colegas do laboratório Kitajima-san, Kido-sensei, Muranaka-san, Sasaki-san, Kohno-san, Nagatani-san, Shamma-sensei e Suzuki-san. Obrigada pelas ótimas lembranças, pela receptividade e todo o aprendizado.

Ao laboratório de Bioquímica da Professora Ana Campa pela ajuda, amizade e empréstimo de material.

Ao laboratório do Professor Mario e Professora Rosário pela utilização do microscópio de fluorescência.

À Professora Marinelce Fagundes dos Santos pelos conselhos e empréstimo de material.

Aos amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP Dani, Lili, Mari, Maira, Simone, Claudia, Erlando, Felipe, Fábio, Denis, Mit pelos anos de sofrimento

e aprendido. Apesar da distância sei que sempre estarão presentes na minha vida. Obrigada pela amizade.

Ao Departamento de Análises Clínicas. Agradeço a todos os funcionários pela ajuda.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa. À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Japan International Cooperation Agency pela bolsa concedida para estágio realizado no Japão durante o curso de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Ghandi

RESUMO

HAGA, R.B. **Inibição da migração mediada pelo gene *RECK* em modelo de glioma humano através de alterações no citoesqueleto e adesão focal.** 2012. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

Gliomas são tumores altamente invasivos, resistentes aos tratamentos disponíveis atualmente e com alta taxa de mortalidade. A superexpressão de RECK na linhagem de glioma humano T98G comprometeu a capacidade das células de migrar e invadir *in vitro*, com rearranjo do citoesqueleto e alteração na distribuição espacial de FAK fosforilado. Entretanto, o possível mecanismo envolvido na inibição da migração mediada por RECK não foi desvendado. Para estudarmos os mecanismos envolvidos nesta alteração da capacidade migratória, as células T98G foram transfectadas com o vetor plasmidial pCXN2-hRECK (RECK⁺). A via das integrinas, a atividade de alguns membros da família das RhoGTPases e elementos do citoesqueleto foram avaliados através de imunoblotting, imunomarcação e ensaios de *pull-down* para as células RECK⁺ em comparação com células T98G não-transfectadas (WT), células T98G transfectadas com vetor pCXN2 na ausência do gene *RECK* (vetor) e fibroblastos primários humanos (FF287). Nossos resultados mostram um aumento na expressão de integrina β_1 e uma diminuição da fosforilação de FAK no sítio de auto-fosforilação Tyr397 que, juntamente com o aumento das fibras de estresse e a diminuição dos lamelipódios, sugerem um fenótipo menos migratório da célula. Porém, quando avaliada a atividade de Rac1, esta se mostrou aumentada, embora uma das vias de ativação de Rac1 seja através da fosforilação de FAK levando à formação dos lamelipódios. A hipótese é que RECK inibe a quebra das adesões focais que participam do processo de migração, dificultando a mobilidade celular. Como as células continuam recebendo o estímulo para migrar, estas ativam Rac1 através de uma via independente de FAK. Além disso, a imunomarcação de paxilina mostrou um aumento no tamanho das adesões focais nas células RECK⁺, indicando que RECK pode influenciar nas estruturas responsáveis pelo contato célula-matriz.

Palavras-chaves: câncer, glioma, RECK, migração, citoesqueleto, adesão focal

ABSTRACT

HAGA, R.B. **RECK-mediated inhibition of glioma migration with changes in cytoskeleton and focal adhesion.** 2012. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

Gliomas are highly invasive, treatment-resistant and lethal tumors. Overexpression of RECK in human glioma cell line T98G decreased cell migration and invasion *in vitro*, lead to cytoskeleton rearrangement and caused changes in phospho-FAK distribution. However, the pathway involved in RECK-mediated inhibition of cell migration has not been elucidated yet. To study the mechanisms by which RECK affects cell motility, T98G cells were transfected with pCXN2-hRECK vector (RECK⁺). Some proteins involved in the integrin pathway, activity of some proteins of RhoGTPase family and cytoskeleton proteins were analyzed through immunoblotting, immunostaining and pull-down assay in RECK⁺ cells and compared with non-transfected T98G cells, T98G transfected with pCXN2 without *RECK* gene and human primary fibroblasts (FF287). Our results showed an increase in integrin β_1 expression and a decrease in FAK phosphorylation in the Tyr397 site, which together with the increase of stress fibers and decrease of lamellipodia, suggest a less migratory phenotype. Despite this, Rac1 activity was increased even though one of Rac activation pathways is through phospho-FAK, leading to lamellipodium formation. Our hypotheses is that RECK affects focal adhesion turnover, diminishing cell motility. As cells are still receiving a positive signal to migrate, they activate Rac1 through a FAK-independent pathway. Besides that, paxillin immunostaining showed that focal adhesions are larger in RECK⁺ cells, indicating that RECK can influence structures related with cell-matrix contact.

Key words: cancer, glioma, RECK, migration, cytoskeleton, focal adhesion

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Gliomas.....	1
1.1.1. Glioblastoma multiforme.....	1
1.2. Migração e Invasão	2
1.3. Gene RECK.....	4
1.4. RECK e glioma	6
1.5. Integrinas.....	7
1.5.1. FAK.....	10
1.5.2. RhoGTPases	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Células.....	15
3.1.1. Doadas pela Dra Mari Cleide Sogayar, Instituto de Química-USP.....	15
3.1.2 Doadas pela Dra Maria Soengas, Departamento de Biologia Molecular do CNIO, Madri, Espanha	15
3.1.3. Doadas pela Professora Alison Colquhoun, Instituto de Ciências Biomédicas, USP	15
3.1.4. Doadas pela Professora Dra Luisa Lina Villa, ICESP, USP	15
3.1.5. Células transfectadas com pCXN2, obtidos no laboratório pela Dra Tatiana Caroline Silveira Côrrea.....	15
3.2. Cultivo celular	16
3.3. Anticorpos.....	16

3.4. Western Blot.....	18
3.5. Imunocitoquímica	19
3.6. Ensaio para avaliação de fosforilação de tirosina para EGFR	20
3.7. Obtenção de proteínas fusionadas ao GST	20
3.8. Ensaio de atividade RhoA, Rac1 e Ras (Pulldown)	21
3.9. Superexpressão do gene RECK utilizando o vetor retroviral pLXSB	22
3.10. Zimografia	22
3.11. Ensaio gelatinolítico	23
3.12. Estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Avaliação da expressão de proteína por Western Blot	24
4.2. Ensaio de pulldown para avaliar a atividade de Rac1, RhoA e Ras	29
4.3. Localização subcelular de proteínas por imunocitoquímica	31
4.4. Ensaio de Zimografia para avaliar a atividade de MMP-2 e MMP-9	36
4.7. Superexpressão de RECK com o vetor retroviral pLXSB em U87.....	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS	50
ANEXO I.....	58
ANEXO II	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gliomas

Gliomas são tumores letais sólidos que têm origem em células de suporte presentes no sistema nervoso central, as células da glia. Eles são a causa mais comum de tumores cerebrais primários em adultos, afetando principalmente homens de 50 a 70 anos. Os fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo tumoral não estão muito claros, mas a exposição ocupacional a solventes orgânicos e pesticidas são citados como fatores de predisposição (Gladson et al., 2010). Aproximadamente 5% dos pacientes têm histórico familiar de glioma. Porém, na maioria dos casos não é possível identificar a causa genética (Wen e Kesari, 2008).

Gliomas são heterogêneos quanto à sua origem histológica e incluem tumores que são compostos predominantemente de astrócitos (astrocitomas), oligodendrócitos (oligodendromas) ou uma mistura de várias células da glia (oligoastrocitoma). A Organização Mundial da Saúde (WHO) classifica os gliomas em níveis de I a IV, baseando-se no grau de malignidade que é determinado pelo critério histopatológico, sendo os tumores de grau III e IV considerados malignos. Apesar da classificação ser baseada principalmente no critério morfológico, características moleculares estão sendo aos poucos incorporadas para auxiliar na diferenciação desses tumores (Huse e Holland, 2010). Os gliomas podem ser formados por um conjunto de etapas que envolvem transformação da célula de origem, aquisição de propriedades invasivas, ativação de sinais de proliferação celular, perda do controle do ciclo celular e ativação da angiogênese.

1.1.1. Glioblastoma multiforme

A transformação maligna dos gliomas resulta em um acúmulo sequencial de alterações genéticas e da desregulação de vias que envolvem fatores de crescimento. As principais modificações que ocorrem nesse tipo de tumor são amplificações e mutações no receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), perda da heterozigose do cromossomo 10q, deleção de *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina deletado do cromossomo 10) e p16, mutação de p53 e alterações na via do retinoblastoma (Rb) (Wen e Kesari, 2008).

Apesar dos avanços recentes no diagnóstico e nos tratamentos em gliomas, que incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, pacientes com glioblastoma (nível mais elevado de malignidade) têm uma expectativa de sobrevida de somente 14 meses. A causa desse mau prognóstico é, em parte, explicado pela alta capacidade que as células do glioma têm de infiltrarem em tecidos cerebrais vizinhos, dificultando a remoção das células transformadas por completo. Uma única célula invade o tecido cerebral normal e consegue estabelecer um micro-tumor, distante do tumor de origem, fazendo com que a remoção cirúrgica do tumor inicial seja só paliativa e não curativa (Berens e Giese, 1999; Louis, 2006; Nakada et al., 2007; Le Mercier et al., 2009).

As células tumorais conseguem invadir todo o cérebro, tendo preferência em infiltrar ao longo da periferia das paredes dos vasos sanguíneos, no espaço subpial da glia ou em tratos de substância branca como o corpo caloso. Esse padrão único de invasão sugere que os gliomas estão adaptados ao microambiente especificamente presente no sistema nervoso central. A composição da matriz extracelular (MEC) do tecido cerebral normal é bastante complexa, sendo constituído principalmente por ácido hialurônico e glicosaminoglicanos. Proteínas de matriz abundantes em outros tecidos como colágeno, vitronectina e fibronectina ou proteínas que compõe a membrana basal como a laminina, estão pouco presentes, sendo encontradas somente em algumas partes do cérebro (Ruoslahti, 1996; Bellail et al., 2004).

1.2. Migração e Invasão

O crescimento de tumores malignos é caracterizado principalmente pelo remodelamento tecidual não controlado no qual o tecido normal é substituído por um tecido tumoral. As principais características das células malignas são a capacidade de superar o controle do microambiente, alterando a homeostase; invadir o tecido adjacente e alcançar sítios distantes do corpo onde formam metástases. A interação entre as células tumorais e o estroma tem um papel importante na progressão tumoral. Elas alteram os tecidos adjacentes ao estroma e modulam o metabolismo das células residentes, resultando na formação de um estroma mais conveniente para células tumorais e não mais para a manutenção da composição fisiológica do tecido (Zigrino et al., 2005). As células tumorais ativam o ambiente do seu estroma

secretando fatores de crescimento e proteases, que podem agir de maneira autócrina e parácrina. Células tumorais precisam remodelar a matriz para facilitar a comunicação e escapar ao controle do microambiente (Mueller e Fusenig, 2004). A capacidade de invasão é um comportamento complexo adquirido por diversos tipos celulares durante a transformação maligna. A natureza invasiva dos gliomas é totalmente dependente das interações célula-MEC.

A MEC é um importante componente do tecido nervoso e está envolvido no remodelamento, que ocorre no desenvolvimento ou reparo, tanto do tecido normal quanto do tecido patológico (Zamecnik, 2005). Um dos primeiros eventos na invasão é a adesão das células tumorais à MEC. Para migrar e invadir, as células precisam estabelecer interações transitórias adesivas com a MEC onde há uma relação bifásica entre a força de adesão e a velocidade de migração. As integrinas, juntamente com o receptor CD44, são os receptores responsáveis pela adesão célula-MEC. Essas moléculas são utilizadas pelas células neoplásicas para interagir com o meio extracelular e migrar ao longo dos componentes da MEC (Bellail, 2004). As células do glioma aderem às proteínas da MEC de regiões vizinhas, sendo este um passo muito importante, já que a célula tumoral precisa de tração para se locomover no ambiente tridimensional. A adesão célula-MEC é acompanhada pela proteólise da matriz, realizada principalmente por metaloproteínases de matriz (MMPs) secretadas pelas células do glioma ou por células endoteliais (Goldbrunner et al., 1999). Como resultado da atividade dessas proteases, mudanças importantes nas interações célula-célula e célula-MEC ocorrem, e novos sinais são gerados na superfície celular. Esses sinais afetam a expressão gênica, influenciando de forma crítica a proliferação, sobrevivência, diferenciação e motilidade das células (DeClerk et al., 2004).

Mudanças na morfologia da célula também ocorrem, levando à polarização celular e formação de protrusões na membrana. A formação de âncoras na membrana permite a contração do citoesqueleto, o que por sua vez, possibilita que a célula se mova para frente (Nakada et al., 2007). Vários tipos de cânceres, incluindo o glioma, apresentam células tumorais que podem formar protusões ricas em actina com atividade proteolítica sobre a MEC chamadas de invadopodia. Essas estruturas aderem e são capazes de induzir a digestão de colágeno, laminina e fibronectina. Invadopodias são dependentes da concentração de proteínas envolvidas na adesão

celular, transdução de sinal, agrupamento de actina, regulação da membrana e proteólise da MEC (Stylli et al., 2008). Devido a modificações na matriz, essas protrusões celulares se estendem através do novo espaço criado e finalmente, a célula inteira migra pela reestruturação do citoesqueleto, levando à expressão de novos sítios de adesão. As células do glioma invadem por migração ativa para novos espaços criados pela degradação da MEC por MMPs e outras proteases. Porém, é importante que exista substrato remanescente suficiente para que a célula possa aderir para que ocorra a contração da célula (Goldbrunner et al., 1999).

Apesar do processo de invasão que ocorre em tumores primários cerebrais apresentar características comuns ao processo de invasão de outros tumores, as células do glioma têm um padrão único de invasão e raramente ocorre metástase fora do tecido cerebral (Bellail et al, 2004; Claes et al., 2007; Le Mercier et al., 2009). Sabe-se que interações da célula tumoral com o microambiente são cruciais em muitas etapas da invasão, contribuindo para o alto nível de complexidade desse processo. Os genes supressores de metástase expressam moléculas que inibem a invasão e metástase das células cancerosas tendo pouco efeito ou nenhum efeito sobre o tumor primário. Essas moléculas podem agir regulando a angiogênese, remodelando a matriz extracelular, regulando a transcrição e transdução de sinais (Bodenstine e Welch, 2008).

1.3. Gene RECK

O gene *RECK* (reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs) foi caracterizado por Takahashi et al., 1998 como um gene supressor de tumor e metástase. Este gene foi isolado através da busca em uma biblioteca de cDNAs de fibroblasto humano por sequências que conseguissem reverter o fenótipo (“flat-reversion”) de células NIH-3T3 (fibroblatos murinos) transformadas com *v-Ki-ras*. *RECK* codifica uma glicoproteína de 110kDa ancorada à membrana com 971 resíduos de aminoácidos, ricos em cisteína (9,2%) e contém regiões hidrofóbicas tanto na região NH₂- terminal quanto em COOH- terminal. Estudos indicam que a região hidrofóbica NH₂- terminal funciona como um peptídeo sinal enquanto a região COOH- terminal funciona como um sinal para a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) pela qual RECK se liga à membrana plasmática. A porção média da proteína contém três domínios semelhantes aos inibidores de serina-proteases, sendo um deles compatível com a sequência consenso do motivo Kazal. Além disso, há duas

regiões de repetição de baixa homologia com o fator de crescimento epidérmico (EGF), motivos de cisteína na região NH₂- terminal e cinco sítios com potencial de glicosilação (Takahashi et al, 1998; Noda et al, 2003).

A expressão de RECK pode ser detectada em vários tecidos normais humanos ou em culturas de células derivadas desses tecidos, enquanto em muitas linhagens de células derivadas de tumores sua expressão é muito baixa ou indetectável, pois o gene *RECK* pode ter sua expressão diminuída por diversos oncogenes, incluindo *ras*. Em 1999, Sasahara et al. demonstraram que o sítio Sp1 do promotor de *RECK* está envolvido na supressão desse gene pela via de Ras. Além disso, a expressão de RECK pode ser regulada por estímulos extracelulares, como concentração de soro e densidade celular, através de várias vias de sinalização; e por supressão pós-transcricional por grupos de micro-RNAs (ex.: miR-21) que respondem a fatores de crescimento e hipóxia (Noda et al., 2010).

A restauração da expressão de RECK em linhagens de células tumorais resulta em forte supressão da invasão, metástase e angiogênese tumoral (Noda et al, 2003; Meng et al, 2008). Além disso, estudos mostraram a relação entre a expressão de RECK e melhor prognóstico de pacientes em vários tipos tumorais como em tumores da mama (Yue et al., 2012), colo-retal (Takeuchi et al., 2004; Stenzinger et al., 2012) e próstata (Reis et al., 2011). Porém, os mecanismos que expliquem esse fato não estão muito claros.

As funções de RECK parecem ser muitas e aos poucos estão sendo descritas. Até agora se sabe que RECK regula negativamente pelo menos três metaloproteinases de matriz (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP), podendo atuar no controle da expressão, liberação e ativação dessas enzimas. Além disso, RECK também tem uma ação chave na regulação da angiogênese no desenvolvimento tumoral e parece ser essencial durante o desenvolvimento embrionário, já que camundongos *knock-out* para o gene *RECK* morrem por volta do décimo dia de desenvolvimento, apresentando algumas características observadas em ensaios de mutação nula de MMP-2 (Takahashi et al., 1998; Oh et al., 2001, Takagi et al., 2009). Mais recentemente, dois trabalhos mostram o papel de RECK na proliferação celular. Kitajima et al., 2010 descreve RECK como sendo um novo regulador da via de EGFR/Ras, além de sugerir que o efeito inicial da deleção de *RECK* em fibroblastos embrionários murinos (MEFs) ocorre no ciclo celular e na senescência.

Yoshida et al., 2011 descreve o papel de RECK na via de SKP2-p27^{KIP1} na supressão da proliferação de células tumorais, levando à uma diminuição na expressão de SKP2 e aumento na expressão de p27.

1.4. RECK e glioma

Em 2006, Corrêa et al. obtiveram uma correlação inversa entre a expressão de RECK e de MMPs em linhagens não-invasiva e invasiva de gliomas. Observou-se que na linhagem não-invasiva A172, a expressão de RECK era maior e a de MMP-2 e MMP-9 eram menores do que na linhagem invasiva T98G. Isso levantou a hipótese de que o gene *RECK* estaria envolvido na inibição da invasão no modelo de glioma através da sua ação sobre as MMPs. Em 2010, Corrêa et al. superexpressaram o gene *RECK* na linhagem T98G para investigar sua ação sobre as MMPs durante os processos de migração e invasão *in vitro*. Observou-se que as habilidades de migração e invasão das células foram altamente afetadas sem a alteração nos níveis de MMPs. Os resultados mostraram que a superexpressão de RECK não comprometeu a função das MMPs, mas foi responsável pelo rearranjo do citoesqueleto e por diferenças na distribuição espacial de FAK-fosforilada, o que certamente alterou a motilidade celular.

Segundo Morioka et al., 2009, em fibroblastos murinos, RECK é abundante em torno da região perinuclear, nas limitações membranares e na superfície celular. Neste modelo, RECK regula a degradação da matriz extracelular, permitindo que as células formem adesões célula-substrato apropriada e mantenham a polaridade antero-posterior (AP) durante a migração. Esse mecanismo é comprometido em células malignas. Células que apresentam expressão de RECK reduzida mostram uma diminuição no espalhamento, polaridade AP ambígua, e aumento na velocidade e diminuição do direcionamento da migração.

As adesões focais (AF) em torno das células e a orientação circular das fibras de actina ao longo da periferia celular suportam a idéia de que a falta de RECK leva à célula a não conseguir se aderir de forma firme ao substrato. RECK é necessário na regulação da degradação da matriz extracelular e ajuda na estabilização das AFs e na polaridade AP em fibroblastos normais (Morioka et al., 2009). Estes resultados se correlacionam com os encontrados por Corrêa et al., 2010 no modelo de glioma

humano, indicando que a expressão de RECK, uma vez resgatada, atua na inibição da migração de células tumorais.

Baseado nos resultados obtidos em nosso laboratório por Corrêa et al., este projeto busca estudar outros genes que possam estar envolvidos na inibição da migração e invasão no modelo de glioma pela ativação do gene *RECK*. Os possíveis alvos escolhidos são os genes *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina deletado do cromossomo 10), *FAK* (quinase de adesão focal), *ERK* (quinase regulada por sinal extracelular) e proteínas da família das RhoGTPases por se encontrarem na via das integrinas que são receptores transmembrana com papel importante na migração celular (Figura 1).

Figura 1: Regulação da migração celular por integrinas, fatores de crescimento e PTEN. A via de sinalização que regula a velocidade e persistência de migração pode ser alterada pela reconstituição da expressão de PTEN e pela superexpressão de moléculas sinalizadoras que afetam alguns passos específicos na via de transdução do sinal (Adaptado de Yamada e Akari, 2001).

1.5. Integrinas

As integrinas são uma família de glicoproteínas transmembrana que atuam como receptores, mediando principalmente interações célula-matriz. Esses receptores são heterodímeros, formados por uma subunidade α e outra β , associadas não-covalentemente. Existem até o momento 18 subunidades α e 8

subunidades β descritas que combinam para formar 24 integrinas. Esses receptores se ligam a diferentes componentes da matriz, variando na afinidade da ligação. Algumas integrinas são expressas amplamente, enquanto outras são expressas dependendo do tipo de tecido ou do estágio de desenvolvimento (Brakebusch e Fässler, 2003; Berrier e Yamada, 2007).

Estudos bioquímicos, genéticos e estruturais mostram uma interligação das integrinas com sinalizações envolvendo fatores de crescimento e citocinas, assim como seu papel na regulação do citoesqueleto de actina (Brakebusch e Fässler, 2003). Dessa forma, a ligação de componentes da MEC às integrinas leva a geração de sinais específicos (sinalização de fora para dentro da célula) que contribuem para a regulação de várias funções celulares, como proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular. Alterações tanto na expressão de moléculas da MEC quanto em receptores de superfície durante a neoplasia podem levar a profundas modificações celulares (Gladson, 1999).

Além da sinalização de fora para dentro das células, as integrinas também são capazes de regular sua afinidade pelos ligantes extracelulares através de mudanças conformacionais dos seus domínios extracelulares. Essas mudanças ocorrem em resposta a sinais que afetam a porção citoplasmática das integrinas e é chamada de sinalização de dentro para fora da célula. Tanto a sinalização de fora para dentro quanto a de dentro para fora requerem uma regulação dinâmica e temporal de múltiplos complexos que são formados ao redor das caudas citoplasmáticas das integrinas (Harburger e Calderwood, 2009).

O citoesqueleto é composto de três estruturas filamentosas principais: filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos. A interação coordenada entre essas três estruturas é muito importante para a migração celular e o remodelamento tecidual. Porém, será dado um enfoque maior aos filamentos de actina, já que essa estrutura é a que mais influencia a forma celular e a sua capacidade de se locomover. A polimerização da actina e proteínas envolvidas na regulação da organização desses filamentos são essenciais para a regulação da protrusão membranar e migração celular. O rearranjo do citoesqueleto de actina é mediado por vias moleculares bastante complexas que promovem polimerização e despolimerização de actina. A polimerização local de actina pode levar à formação

de protrusões membranares e favorecer a interação célula-matriz através de integrinas (Berrier e Yamada, 2007).

As integrinas são a principal ligação entre a MEC e o citoesqueleto de actina. Quando esses receptores não estão ligados às moléculas da MEC, são geralmente distribuídos de forma difusa ao longo da superfície celular e não apresentam qualquer ligação com o citoesqueleto de actina. A ligação de moléculas da MEC leva ao cluster de integrinas, causando o recrutamento de filamentos de actina e proteínas de sinalização para os domínios citoplasmáticos desses receptores. Dependendo do estado de organização do citoesqueleto, o cluster de integrinas pode dar origem aos complexos focais (complexos nascentes ou em processo de formação) ou às adesões focais (grandes complexos maduros). Adesões focais são grandes agregados de integrinas que estão localizados no final de feixes de filamentos de actina denominados fibras de estresse (Schoenwaelder e Burridge, 1999; Brakebusch e Fässler, 2003).

Como as caudas citoplasmáticas das integrinas não apresentam atividade enzimática, são necessárias moléculas acessórias para que as funções dessa via sejam exercidas. Até o momento foram identificadas 156 moléculas com funções sinalizadoras, estruturais e adaptadoras. As moléculas associadas às integrinas são multifuncionais e podem ser divididas em quatro grandes grupos: proteínas ligadas à integrina que se ligam diretamente à actina (ex.: talina, α -actinina e filamina); proteínas ligadas à integrina que indiretamente se associam com/ou regulam o citoesqueleto (ex.: kindlina, ILK, paxilina e FAK); proteínas que fazem ligação actina-actina, mas não se ligam à integrina, servindo para reforçar a ligação citoesqueleto-integrina (ex.: vinculina); e moléculas adaptadoras e sinalizadoras que regulam as interações dos grupos citados acima (Legate et al., 2010).

As integrinas precisam se desligar de seus ligantes e desfazer os complexos multiprotéicos intracelulares para que a sinalização de adesão seja interrompida e a migração celular seja facilitada. Dependendo das condições, as adesões podem se desfazer totalmente, se remodelar ou se mover. Essas mudanças são obtidas pela alteração da extensão de associação das proteínas acessórias com o complexo de adesão através de competição, fosforilação e proteólise, envolvendo possivelmente também forças externas aplicadas (Harburger e Calderwood, 2009).

A migração direcionada requer o estabelecimento de polaridade celular criando uma frente de migração. A frente de migração apresenta atividades de protrusão da membrana, direcionadas pela polimerização de actina, estabelecendo novos contatos. Já na parte posterior da célula, as adesões celulares são desfeitas para promover a retração celular, permitindo o movimento para frente. A taxa de migração celular pode ser limitada pela taxa de retração celular. Portanto, a formação e rompimento das adesões célula-matriz são essenciais para a que a célula possa migrar (Berrier e Yamada, 2007).

Em resumo, uma vez que os componentes da MEC se ligam às integrinas, uma cascata de sinalização é ativada afetando a formação, a quebra (*turnover*) e ligação dos filamentos de actina às adesões. A formação e remodelamento dos contatos focais é um processo dinâmico sob a regulação de proteínas do tipo tirosina quinases e pequenas GTPases da família Rho, como RhoA, Rac1 e Cdc42 (Parsons et al., 2000). Essas moléculas são essenciais para a organização do citoesqueleto de actina e promovem a formação de estruturas especializadas como as fibras de estresse (RhoA), lamelipódio (Rac1) e filopódio (Cdc42). Integrinas podem estimular RhoGTPases por diferentes vias, sendo que a mais importante parece ser a via FAK-Src quinases (Brakebusch e Fässler, 2003).

1.5.1. FAK

Interações de vários tipos celulares com seu microambiente, via receptores de membrana (integrinas e receptores de fator de crescimento), induzem sinais intracelulares que são transmitidos através de vetores como FAK (quinase de adesão focal). A família de FAK tem um importante papel em eventos intracelulares como proliferação, migração, sobrevivência e *anoikis* (apoptose depois que há perda de interações da célula com a matriz). FAK é uma tirosina quinase citoplasmática amplamente expressa. É composta de diferentes domínios o que permite que essa proteína participe de diferentes vias de sinalização, envolvendo receptores de fatores de crescimento e moléculas que participam da via das integrinas (Cary e Guan, 1999).

FAK regula a dinâmica dos complexos presentes nas adesões focais. Funções específicas de FAK dependem tanto da natureza do estímulo que induz o movimento quanto do fenótipo da célula. A ligação de integrinas aos componentes

da MEC leva à uma sequência de eventos inter e intramoleculares que resultam na auto-fosforilação na tirosina 397 de FAK. A fosforilação nesse sítio está correlacionada com um aumento da atividade catalítica de FAK e parece importante na fosforilação de proteínas associadas ao complexo focal como paxilina e p130^{Cas}. A fosforilação da tirosina 397 também gera um sítio de alta afinidade que reconhece o domínio SH2 da família das Src quinases e leva ao recrutamento e ativação de Src através da formação de um complexo formado por essas duas quinases (FAK-Src). Ativação do complexo FAK-Src é central para a regulação de vias que controlam o espalhamento da célula, migração e sobrevivência celular. (Parsons et al., 2000; Schwock et al., 2010).

Como mencionado, dois alvos que se encontram subsequentes e que são essenciais à FAK são paxilina e p130^{Cas}. Paxilina é uma proteína adaptadora que não apresenta atividade quinase intrínseca e pode ser fosforilada nos sítios tirosina 31 e tirosina 118. Mutações de FAK que impedem a ligação dessa molécula com paxilina afetam a localização de FAK nos contatos focais. Paxilina também está envolvida na regulação de sinalização que é ativada pela via das MAPK devido à sua ligação com Grb2. Em um estudo recente em câncer de mama, o silenciamento de p130^{Cas} exerceu efeitos similares aos causados com o silenciamento de FAK, o que demonstra a importância das moléculas que são ativadas por FAK dentro de um complexo de adesão focal. A sinalização p130^{Cas} seguida de Crk, DOCK180 e Rac está relacionada com “ruffling” membranar, formação do lamelipódio e motilidade celular. Perda de FAK leva à diminuição na fosforilação de p130^{Cas} no sítio tirosina 410 e de paxilina no sítio tirosina 118. FAK também contribui para uma regulação negativa de Rho/ROCK com conseqüente redução de fibras de estresse e tensão do citoesqueleto através de uma via que envolve GRAF (GAP de Rho associada com FAK) e p190RhoGAP (Schwock et al., 2010).

A superexpressão e ativação de FAK são encontradas em vários cânceres humanos, incluindo os gliomas. A sinalização integrina-FAK ativa várias cascatas de sinalização através de fosforilação e interações proteína-proteína que promovem a tumorigênese. Enquanto alguns estudos sugerem que a ativação de FAK ocorre somente durante a proliferação celular em gliomas, outros mostram envolvimento na ativação de Rac, o que leva à polimerização de actina e formação de protrusões celulares, adesão focal e conseqüente mobilidade celular (Goldbrunner et al., 1999;

Claes et al., 2007; Zhao e Guan, 2009). A atividade aumentada de FAK parece ter relação com um aumento na atividade de Src, aumento de Src fosforilada e elevada atividade de ERK-2 (D'Abaco e Kaye, 2007). A rota subsequente envolve PI3K, ERK, Akt e PTEN que serão devidamente exploradas neste projeto.

1.5.2. RhoGTPases

A regulação dinâmica da adesão celular é de particular importância quando as células se movem em resposta a algum estímulo, seja ele um ligante imobilizado (ex.: componentes da MEC) ou solúvel (ex.: fatores de crescimento ou citocinas). O movimento celular é altamente dependente da reorganização dinâmica do citoesqueleto de actina, um processo altamente relacionado com a ativação de membros da família das RhoGTPases. A família de proteínas Rho (Ras homólogo) é composta de 20 membros, incluindo Cdc42, Rac1 e RhoA. As RhoGTPases regulam o remodelamento do citoesqueleto, como por exemplo, induzindo a polimerização dos filamentos de actina em redes com fibras lineares e ramificadas (Parsons et al, 2000).

Como todas as pequenas GTPases, as proteínas Rho ciclam entre uma forma ativa, quando ligadas ao GTP; e outra inativa, quando ligadas ao GDP. Esse ciclo é regulado por dois tipos de moléculas, as GEFs (fator de excisão de nucleotídeos guanina) e as GAPs (proteínas ativadoras de GTPases). As GEFs são responsáveis por ativar as proteínas Rho, retirando a molécula de GDP para que GTP se ligue, enquanto as GAPs fazem o caminho inverso. Mais de 70 proteínas que regulam as proteínas Rho foram descritas. Além disso, as proteínas Rho podem regular umas às outras. Cdc42 pode ativar Rac1 e Rac1 pode regular a atividade de RhoA. O balanço temporal e espacial entre as atividades das diferentes GTPases é de grande importância para muitos processos celulares como adesão célula-célula e célula-matriz, migração celular, polarização celular e transição epitélio-mesênquima (TEM). Também existem outras moléculas que regulam as RhoGTPases, as proteínas GDI (inibidores da dissociação de nucleotídeos guanina). As RhoGTPases passam por modificações pós-transducionais na região C-terminal com a adição de um grupo lipídico por prenilação ou palmitoilação, fazendo com que as RhoGTPases consigam

interagir com a membrana plasmática. As proteínas GDI se ligam à região C-terminal e impedem a adição do grupo lipídico, inibindo a interação das RhoGTPases com a membrana, o que previne a interação com muitas moléculas efetoras (Iden e Collard, 2008; Vega e Ridley, 2008).

A interação de integrinas com a matriz regula a atividade dos membros da família das RhoGTPases e sua localização com proteínas efetoras. Dessa forma, as adesões entre a célula e a matriz estabelecem *loops* de feedback que controlam a protrusão membranar e a retração durante a migração celular. Várias evidências apontam a ativação dependente do complexo FAK/Src, ativando o complexo p130^{Cas}/Crk, como a via central da migração induzida pela matriz ou fatores de crescimento (Parsons et al., 2000; Berrier e Yamada, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal desse trabalho é elucidar os mecanismos envolvidos na inibição da migração de células de gliomas invasivos através da superexpressão do gene *RECK*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de proteínas por Western Blot que participam da via das integrinas.
- Avaliar a localização de proteínas que participam do processo de migração por imunocitoquímica.
- Avaliar a atividade de proteínas que participam da migração celular, especialmente as proteínas da família das RhoGTPases, por ensaio de pull-down.
- Avaliar a atividade de metaloproteinases de matriz através do ensaio de zimografia.
- Gerar células T98G e U87 que expressam RECK utilizando o vetor retroviral pLXSB e validar a expressão protéica por Western Blot.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Células

3.1.1. Doadora pela Dra Mari Cleide Sogayar, Instituto de Química-USP

T98G: (ATCC #CRL 1690) Linhagem celular de origem de glioblastoma multiforme humano, com propriedade aderente e morfologia semelhante ao fibroblasto, com potencial altamente invasivo quando cultivado em matrigel segundo Nakagawa et al, 1996.

3.1.2 Doadora pela Dra Maria Soengas, Departamento de Biologia Molecular do CNIO, Madrid, Espanha

FF287: fibroblasto normal obtido de cultura primária.

3.1.3. Doadora pela Professora Alison Colquhoun, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

U87: (ATCC #HTB-14) Linhagem celular de origem de glioblastoma multiforme humano, com propriedade aderente e morfologia epitelial, com potencial tumorigênico.

3.1.4. Doadora pela Professora Dra Luisa Lina Villa, ICESP, USP

HT1080: (ATCC #CCL-121) Linhagem celular de fibrosarcoma humano, como propriedade aderente e morfologia epitelial.

3.1.5. Células transfectadas com pCXN2, obtidos no laboratório pela Dra Tatiana Caroline Silveira Côrrea

As células T98G foram transfectadas com o vetor pCXN2, contendo a sequência ou não do gene *RECK*, utilizando Lipofectamina 2000 e antibiótico G418 para a seleção das células transfectadas (Corrêa et al., 2010).

pCXN2: célula T98G contendo o vetor pCXN2 sem o gene de interesse. Controle do vetor.

RECK⁺: célula T98G contendo o vetor pCXN2 com o gene de interesse *RECK*.

3.2. Cultivo celular

Todas as células foram cultivados em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com soro fetal bovino à 10% e antibióticos (penicilina e estreptomicina). O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa à 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de umidade.

3.3. Anticorpos

Para os ensaios de Western Blot foram utilizados os seguintes anticorpos.

Anticorpos	Tamanho proteína (kDa)	Catálogo	Empresa
Integrina β_1	115/130	#4706	Cell Signaling Technologies
Akt	60	#9272	
Akt (Ser473)	60	#9271	
Erk1/2	42/44	#9102	
Erk1/2(Thr202/Tyr204)	42/44	#9101	
PTEN (138G6)	54	#9559	
PTEN (Ser308/Thr382/383)	54	#9554	
FAK	125	#3285	
α -tubulina	50	T6199	Sigma
Rac (23A8)	21	R2650	
RhoA (26C4)	24	sc-418	Santa Cruz
EGFR	170	sc-03	
Ras	21	610002	BD, Franklin Lakes,

RECK	110	611513	NJ
paxilina	68	AHO0492	Invitrogen
vinculina	130	700062	
FAK[Y397]	125	44-625G	

Para os ensaios de imunocitoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos.

Anticorpos	Catálogo	Empresa
RECK	611513	BD, Franklin Lakes, NJ
paxilina	AHO0492	Invitrogen
vinculina	700062	
rodamina-faloidina	R415	
Rac (23A8)	R2650	Sigma
RhoA (26C4)	sc-418	Santa Cruz

Os anticorpos secundários utilizados foram:

Anticorpos	Catálogo	Empresa
Anti-coelho IgG conjugado com peroxidase	NA934	GE Healthcare
Anti-camundongo IgG conjugado com peroxidase	NA931	
Texas Red [®] goat anti-coelho IgG	T2767	Invitrogen
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-camundongo IgG	A11001	

3.4. Western Blot

Obtenção dos extratos protéicos

Os extratos protéicos totais foram obtidos utilizando o tampão RIPA (50mM Tris, pH 8,0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA) ou o tampão MLB (*Mg²⁺ Lyses Buffer*) (25mM Hepes, pH 7,5, 0,15mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,25% desoxicolato de sódio, 10% glicerol, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA), dependendo das condições experimentais, suplementados com um coquetel de inibidores de proteases (1:100, Sigma-Aldrich, St. Louis) e um coquetel de inibidores de fosfatases (1:100, Sigma-Aldrich, St. Louis). A quantificação protéica foi feita através do método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina (BSA) (1mg/mL) como padrão. Todas as dosagens foram feitas em triplicata. A curva-padrão foi obtida por dosagem de BSA nas quantidades de 0; 2; 4; 6; 8 e 10µg. A absorbância das amostras foi lida à 595nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi determinada a partir da curva obtida por regressão linear dos valores padrões de BSA.

Separação das proteínas em gel de poliacrilamida e transferência para membrana

Para a separação das proteínas foram feitos géis de poliacrilamida sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) de concentrações de 8%, 10% e 15%. Em cada canaleta foram colocados de 30-40µg de extrato protéico total em tampão de amostra (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) aquecido à 95°C por 5 minutos. Em cada gel foram aplicados 5µl de marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad #161-0374). Para a eletroforese foi utilizado o tampão de eletrodo (25 mM Tris base, 190 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). A transferência úmida das amostras de proteína para uma membrana de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) foi realizada à 4°C, utilizando tampão de transferência (25 mM Tris base, 190 mM glicina, 20% metanol). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau (Ponceau 0,1%, 10% ácido acético) para confirmação.

Incubação com anticorpos

Antes da imunomarcação, os sítios inespecíficos foram neutralizados com solução de bloqueio (5% de leite desnatado em pó em TBS/T [20 mM Tris HCl, pH

7,3, 137 mM NaCl e 0,1% Tween-20 (V/V)] sob agitação contínua por 1 hora à temperatura ambiente ou *overnight* à 4°C. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído seguindo as especificações da bula. A incubação foi realizada sob constante agitação à 4°C *overnight*. Após 3 lavagens de 15 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário em TBS-T sob agitação constante durante 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas 3 vezes por 15 minutos com TBS-T, e em seguida reveladas com kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) e expostas ao filme de raio-x (Amersham Hyperfilm ECL) em tempos variados. A intensidade das bandas foi determinada utilizando o *software Image J* e os valores foram normalizados pela intensidade das bandas obtidas nos controles de quantidade de proteína aplicada.

3.5. Imunocitoquímica

Células cultivadas em lamínulas foram cultivadas até atingir a confluência. Utilizando uma ponteira de 1000uL, foi feita uma “ferida” na região central da lamínula. Depois de 4 horas, as lamínulas foram submetidas ao processo de fixação em 4% paraformaldeído por 20 minutos. Depois de lavar 3X com PBSA por 10 minutos, as células são permeabilizadas com 0,1% de Triton-X em PBSA por 10 minutos. As lamínulas foram lavadas 3X por 5 minutos com PBSA e incubadas com uma solução de bloqueio com 1% BSA em PBSA por 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo primário diluído em PBSA contendo 1% BSA foi adicionado e deixado por 45 minutos em temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas 3X com PBSA por 10 minutos e a seguir foi adicionado o anticorpo secundário diluído em PBSA contendo 1% BSA. Após 30 minutos, as lamínulas foram novamente lavadas 3x com PBSA por 5 minutos, sendo que na última lavada DAPI foi adicionado à solução. A montagem da lâmina foi feita com Prolong® Antifade (Invitrogen) e selada com esmalte. A visualização do imuno-complexo contendo fluoresceína foi feita através da utilização de um microscópio de fluorescência (Leica DM5000B – Leica Microsystems) e as imagens foram obtidas através do *software* Leica Application Suite V3.30.

3.6. Ensaio para avaliação de fosforilação de tirosina para EGFR

Células 70-80% confluentes foram lisadas com tampão MLB (25mM Hepes, pH 7,5, 0,15mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,25% desoxicolato de sódio, 10% glicerol, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA) suplementado com inibidores de proteases (1:100, Sigma) e inibidores de fosfatases (1:100, Sigma). O extrato protéico contendo 500ug de proteínas totais foi incubado com o anticorpo anti-fosforilação de tirosina (pTyr) (PY99, Santa Cruz Biotechnology) sob agitação *overnight* à 4°C. Proteínas com a tirosina fosforilada foram imunoprecipitadas e os imunoprecipitados foram coletados adicionando-se *beads* de proteína A-agarose (20334, Pierce, Rockford, IL, USA) por 2 horas sob agitação constante à 4°C. As *beads* contendo o imunoprecipitado foram lavadas 5 vezes com tampão de lise. Depois da última lavagem, as *beads* foram ressuspensas em tampão de amostra (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) e as amostras foram aquecidas à 95°C por 5 minutos. A identificação das proteínas foi realizada por eletroforese seguida de imunomarcação com o anticorpo anti-EGFR.

3.7. Obtenção de proteínas fusionadas ao GST

Os plasmídeos pGEX-Raf-RBD e pGEX-PAK-PBD foram gentilmente doados por membros do laboratório do Professor Chiaki Takahashi. Para produção em grande escala, 100ul de bactérias DH5α competentes foram transformadas com os plasmídeos de interesse e espalhadas em placas de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani)-ágar, suplementado com 0,1mg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas *overnight* à 37°C. Uma colônia de cada placa foi obtida e inoculada em 200ul de meio LB contendo 0,1mg/mL de ampicilina. As amostras foram incubadas *overnight* à 37°C sob constante agitação. No dia seguinte, os 200ul foram então transferidos para um Erlenmeyer contendo 200mL de meio LB contendo 0,1mg/mL de ampicilina e mantidas à 37°C sob constante agitação. Depois de 3 horas, IPTG (isopropiltiogalactosídeo, Sigma) foi adicionado na concentração final de 0,1mM em cada frasco e as amostras foram mantidas por mais 3 horas nas mesmas condições.

Os volumes de cada Erlenmeyer foram transferidos para tubos de 50mL e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 3000rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em um tampão de lise (40mM Tris, pH 7,5, 5mM

EDTA, 1% Triton X-100), contendo inibidores de proteases (Protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Mannheim, Germany). O lisado foi sonicado por 15 segundos e aliquoteado em eppendorfs de 1,5mL. Foram separados 200ul do lisado para purificação e confirmação da qualidade das proteínas fusionadas.

As alíquota de 200ul foram centrifugadas por 10 minutos à 13.500rpm. Os sobrenadantes foram recolhidos e incubados com uma solução contendo *beads* Glutathiona-Sepharose 4B (17-0756-01, GE Healthcare). As amostras ficaram em agitação por 1 hora à 4°C. Depois de 4 lavagens com o tampão de lise, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol) e aquecidas à 95°C por 5 minutos.

As amostras foram aplicadas em um gel de SDS-PAGE de 15% e submetidas à eletroforese. O gel foi incubado em agitação por 1 hora com 0,5% *Coomassie brilliant blue* R-250 e *overnight* com uma solução de descoloração (7,5% ácido acético, 5% metanol) para a visualização das bandas. A quantidade de proteína foi estimada por comparação com bandas de BSA com quantidades de proteína conhecidas.

3.8. Ensaio de atividade RhoA, Rac1 e Ras (*Pulldown*)

As atividades de RhoA e Rac1 das células T98G, T98G-pCXN2 e T98G-pCXN2-hRECK, foram determinadas usando os kits Active RhoA Pull-Down and Detection Kit e Active Rac1 Pull-Down and Detection Kit (Pierce, Rockford, IL, USA), respectivamente. Os ensaios foram realizados seguindo o manual do fabricante.

As atividades de Rac1 para T98G-pLXSB e T98G-pLXSB-hRECK e Ras para T98G-pCXN2 e T98G-pCXN2-hRECK foram realizados seguindo o protocolo a seguir. Células 70-80% confluentes e incubadas *overnight* com meio DMEM sem SFB foram lisadas com tampão MLB (25mM Hepes, pH 7,5, 0,15mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,25% desoxicolato de sódio, 10% glicerol, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA) suplementado com inibidores de proteases (1:100, Sigma) e inibidores de fosfatases (1:100, Sigma). Os extratos protéicos contendo entre 1000ug de proteínas totais foram incubados com volumes iguais de *beads* Glutathiona-Sepharose 4B (17-0756-01, GE Healthcare) que haviam sido previamente incubadas com o sobrenadante do lisado de bactérias contendo as proteínas Raf-RBD-GST e PAK-PBD-GST (item 3.7)

para identificação de proteínas Ras ativa e Rac1 ativa, respectivamente. As amostras foram incubadas *overnight* à 4°C. Depois de 4 lavagens com o tampão de lise, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) e aquecidas à 95°C por 5 minutos.

A identificação das proteínas ativas foi feita por eletroforese seguida de imunomarcação utilizando os anticorpos anti-Ras e anti-Rac1. Também foram preparadas amostras com o extrato total para a determinação da quantidade total de cada proteína estudada.

3.9. Superexpressão do gene *RECK* utilizando o vetor retroviral pLXSB

Células T98G e U87 foram infectadas por vírus contendo o vetor retroviral pLXSB (Miki et al., 2007), contendo o gene *RECK* fusionado à sequência FLAG, vetor este doado pelo Professor Chiaki Takahashi, Universidade de Kanzawa, Japão. Inicialmente, o vetor retroviral contendo ou não a sequência do gene de interesse é transfectado nas células AmphoPack-293 (631505, Clontech), de acordo com protocolo padrão. O vetor retroviral sem a sequência de interesse foi utilizado para a geração do controle (vetor). O empacotamento viral gera as partículas virais inativas que foram secretadas no meio de cultura das células AmphoPack-293. As linhagens de glioma humano foram, então, infectadas com este título viral e os clones transduzidos foram selecionados na presença de 8μg/mL do antibiótico blasticidina. A eficiência protéica foi confirmada por Western blot.

3.10. Zimografia

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços descartáveis na seguinte proporção: $1,0 \times 10^4$ células/poço, sendo que cada poço foi recoberto por 1mL de gel de colágeno tipo 1 [2,5 mg/mL] e as culturas foram mantidas por 7 dias. Os meios de cultura foram coletados nos períodos de 3, 5 e 7 dias para serem utilizados no ensaio. Dois dias antes do meio ser coletado, as células foram carenciadas com meio DMEM contendo 1% BSA. Centrifugou-se o meio 2x em 800rpm durante 5 minutos à 4°C. A quantidade de proteína total no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry. Foram aplicadas 25μg de proteína/poço e 10μL de padrão em gel de 10% acrilamida - 1mg/ml de gelatina. A eletroforese foi

realizada à 100V por ~ 90 minutos. O gel foi lavado 2x por 15 minutos cada com 2,5% Triton X-100, com agitação à 37°C. O gel foi novamente lavado 2x por 1 minuto com Tampão de Incubação (0,05M TrisHCl pH 8/ 5mM CaCl₂/ 5μM ZnCl₂) e depois deixado no Tampão de Incubação por 16-17horas à 37°C em recipiente fechado. O gel foi corado com 0,5% *Coomasie brilliant blue* R-250 por 30 minutos, com agitação. Ao final, o gel foi descorado com uma solução 10% metanol e 10% ácido acético glacial.

3.11. Ensaio gelatinolítico

Foram plaqueadas $5,0 \times 10^4$ células em lamínulas circulares recobertas por 1% de solução de gelatina contendo DQTM-gelatina conjugado com fluoresceína – 1:20 (Molecular Probes[®] - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Depois de 24 horas, as lamínulas foram submetidas ao processo de fixação em 4% paraformaldeído por 20 minutos. Depois de lavar 3X com PBSA por 10 minutos, as células são permeabilizadas com 0,1% de Triton-X em PBSA por 10 minutos. As lamínulas foram novamente lavadas 3x com PBSA por 5 minutos, sendo que na última lavada DAPI foi adicionado à solução. A montagem da lâmina foi feita com VectaShield[®] (Vector Laboratories, CA, USA) e selada com esmalte. A visualização da fluorescência foi feita através da utilização de um microscópio de fluorescência (Leica DM5000B – Leica Microsystems) e as imagens foram obtidas através do *software* Leica Application Suite V3.30.

3.12. Estatística

Os resultados dos ensaios foram expressos como média ± desvio-padrão e analisados estatisticamente, utilizando o *software* GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (One-way analysis of variance, ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni), com um valor de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da expressão de proteína por Western Blot

Na Figura 2 são apresentadas as micrografias demonstrando a confluência celular observada no momento dos ensaios de Western Blot. Para os ensaios em baixa confluência (BC), a densidade celular estava em torno de 70-80%. Para os ensaios em alta confluência (AC), a densidade celular era de 100%.

Figura 2: Células T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺); e fibroblasto humano FF287 em placas de cultura de 10cm de diâmetro. Aumento de 100x.

Confirmando novamente o que foi visto por Côrrea et al., 2010, a linhagem T98G apresenta níveis indetectáveis da proteína RECK, enquanto as células RECK⁺ apresentam altos níveis dessa proteína em função da superexpressão utilizando o plasmídeo pCXN2 (Figura 3). De acordo com Hatta et al., 2009, a expressão de RECK é estimulada em altas densidades celulares em duas linhagens de fibroblasto embrionário de camundongo, NIH3T3 e MEF. O mesmo foi observado por Kitajima et al., 2010 na linhagem de fibroblasto embrionário de camundongo (MEF). Como é possível observar na Figura 4, o mesmo ocorre as células RECK⁺ e os fibroblastos humanos FF287. Com o aumento da densidade celular é possível observar que há um aumento na expressão de RECK.

Figura 3: Expressão protéica de RECK. Linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) em condições de alta confluência e baixa confluência celular. Como controle foi utilizado o fibroblasto humano FF287. Quantificação relativa das bandas de RECK nas células RECK⁺. Como controle de quantidade de proteína aplicada foi utilizado α -tubulina.

O próximo passo foi avaliar a expressão das integrinas, já que esta foi a via escolhida para iniciarmos este estudo. Como mencionado anteriormente, existem 24 integrinas descritas que variam em relação à afinidade de ligação com componentes da MEC, expressão e tipo celular. Por esse motivo, a primeira subunidade escolhida para estudo foi a β_1 . Ela é a subunidade mais amplamente expressa e se combina com pelo menos nove subunidades α diferentes.

Com base no resultado das Figuras 4, pode-se observar que dentro de cada grupo, as células RECK⁺ apresentam uma expressão que sugere um aumento em relação aos controles.

Figura 4: Expressão protéica da subunidade integrina $\beta 1$. Linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) em condições de alta confluência e baixa confluência celular. Quantificação relativa das bandas utilizando α -tubulina como controle de quantidade de proteína aplicada.

Depois da ativação das integrinas ocorre a ativação de FAK, o que leva à uma série de fosforilações de moléculas que participam das diversas vias que são ativadas pela interação célula-matriz. As fosforilações ocorrem em moléculas que estão envolvidas em vias relacionadas com proliferação, sobrevivência e migração celular. A expressão e fosforilação elevada de FAK estão associadas com o desenvolvimento de tumores no homem em vários tecidos incluindo mama, cólon, tireóide e próstata; assim como com na progressão para um fenótipo metastático. O aumento na expressão de FAK em gliomas tem sido extensamente descrita e Côrrea et al., 2010, observou uma distribuição alterada de FAK fosforilado, quando avaliado por imunofluorescência nas células da linhagem T98G que expressam RECK.

No ensaio apresentado na Figura 5, foi avaliada a expressão de FAK total e FAK fosforilada no sítio Y397 nas condições WT, vetor e RECK⁺. Pode-se observar que nos dois grupos, as células RECK⁺ apresentam uma expressão reduzida de proteína fosforilada em relação à linhagem parental. Comparando os resultados nas diferentes confluências, o aumento da densidade celular leva a um aumento da fosforilação de FAK. Esse evento se sobrepõe ao feito de RECK, pois no grupo de alta confluência a fosforilação de FAK é maior do que na baixa confluência, mesmo na presença de mais RECK. Existem vários trabalhos mostrando que as proteínas podem ter sua expressão modulada pela densidade celular. Esse fato já havia sido descrito para FAK por Batt e Roberts, 1998 em fibroblastos embrionários de camundongo BALB/3T3.

Figura 5: Expressão protéica de FAK e FAK-fosforilada [Y397]. Linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) em condições de alta confluência e baixa confluência celular. Quantificação relativa entre FAK fosforilada e FAK total.

FAK atua basicamente em duas frentes em relação ao desenvolvimento tumoral. A primeira seria através de vias que estão relacionadas com proliferação e sobrevivência celular, envolvendo principalmente as vias PI3K/Akt e MAPK. A segunda seria através de vias que estão relacionadas com migração, envolvendo principalmente a interação de FAK com a família Rho-GTPases através da fosforilação de p130^{Cas} e paxilina. Dessa forma, buscamos avaliar moléculas envolvidas nessas diferentes vias, começando pelas relacionadas com proliferação e sobrevivência.

O gene *PTEN* é frequentemente deletado ou mutado em uma série de tumores, incluindo o glioblastoma humano. Porém, a linhagem T98G possui *PTEN* selvagem e a fosforilação de PTEN parece inibir tanto à fosforilação de FAK quanto à conversão de PIP₂ para PIP₃ por PI3K, o que leva a uma diminuição na fosforilação de Akt (Tamura et al., 1999). Dessa forma, a expressão de PTEN total/PTEN fosforilado e Akt total/Akt fosforilada foi avaliada para verificar se RECK interfere nessa via.

Nos ensaio apresentados na Figura 6, foram avaliadas a expressão de PTEN total e PTEN fosforilada (serina 380 e treonina 382/383) e a expressão de Akt total e Akt fosforilada (serina 473) nas condições WT, vetor e RECK⁺. A expressão de PTEN total e PTEN fosforilada não é alterada em relação à densidade celular, assim como a expressão de Akt total e Akt fosforilada. Além disso, a expressão de PTEN fosforilada e Akt fosforilada nas células RECK⁺ não apresenta diferença significativa quando comparada aos controles.

Figura 6: Expressão protéica de PTEN total, PTEN fosforilado, Akt total e Akt fosforilada. Linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) em condições de alta confluência e baixa confluência celular. Quantificação relativa entre PTEN fosforilado e PTEN total. Não há diferença estatística significativa (n=3).

FAK ativa ERK principalmente pela via das MAPK. A fosforilação de ERK está relacionada principalmente à proliferação celular. No ensaio apresentado na Figura 7, foi avaliada a expressão de ERK1/2 total e ERK1/2 fosforilado (treonina 202 e tirosina 204) nas condições WT, vetor e RECK⁺. A expressão de ERK1/2 fosforilado nas células RECK⁺ não apresenta diferença significativa quando comparada aos controles. Porém, ERK1/2 fosforilado está bastante diminuído no grupo de alta confluência.

Figura 7: Expressão protéica de ERK1/2 e ERK1/2 fosforilado. Linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) em condições de alta confluência e baixa confluência celular. Quantificação relativa entre Erk fosforilado e Erk total para o grupo de baixa confluência. Não há diferença estatística significativa (n=2).

4.2. Ensaio de *pull-down* para avaliar a atividade de Rac1, RhoA e Ras

Para avaliar a segunda frente pela qual FAK atua no desenvolvimento tumoral, foram feitos ensaios de *pull-down* para verificar a atividade das proteínas Rac1 e RhoA, ambas membros da família das RhoGTPases.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 8 e 9. Pode-se observar na Figura 8 que as células RECK⁺ apresentam um aumento na atividade de Rac1 quando comparado com a linhagem parental. Já na Figura 9, podemos observar que não há diferença entre a atividade de RhoA as células RECK⁺ quando comparado aos controles.

Figura 8: Avaliação da atividade de Rac1. Lisados das células T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) foram incubados com GST-PAK1-PBD (domínio de PAK1 que se liga à Rac1 fusionada com GST) para seleção das proteínas Rac1 ativas. O lisado total foi utilizado para obtenção de Rac total. As células RECK⁺ apresentaram aumento de proteínas Rac1 ativas quando comparado aos controles. GTP: controle positivo do ensaio.

Figura 9: Avaliação da atividade de RhoA. Lisados das células T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) foram incubados com GST-Rotequina-RBD (domínio de ligação da Rho (RBD) da Rotequina que se liga à RhoA fusionada com GST) para seleção das proteínas RhoA ativas. O lisado total foi utilizado para obtenção de RhoA total. Não há diferença entre a atividade de RhoA em RECK⁺ quando comparado aos controles. GTP: controle positivo do ensaio.

Também foi avaliada a atividade de Ras na linhagem T98G, T98G-pCXN2 e T98G-pCXN2-hRECK. Ras tem um papel importante no controle da proliferação de células normais e tumorais. Como mencionado na introdução, RECK foi descoberto quando reverteu o fenótipo maligno de fibroblastos transformados com o oncogene *ras*. Dessa forma, foi realizado um ensaio preliminar para a avaliação da atividade de Ras nas células T98G que superexpressam RECK (Figura 10). O ensaio sugere que a atividade de Ras não é alterada nas células RECK⁺ quando comparadas ao controle.

Figura 10: Avaliação da atividade de Ras. Lisados de T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) foram incubados com Raf-RBD-GST para seleção das proteínas Ras ativas. O lisado total foi utilizado para obtenção de Ras total. Não há diferença entre a atividade de Ras em RECK⁺ quando comparado ao controle.

4.3. Localização subcelular de proteínas por imunocitoquímica

Para estudar o papel das proteínas nas diferentes funções celulares, é muito importante avaliar a localização destas na célula. As proteínas relacionadas com migração celular podem levar a diferentes respostas dependendo de sua localização e ativação nas diferentes regiões celulares. Foram analisadas a localização de RECK, RhoA, Rac1 e paxilina, além da marcação dos filamentos de actina.

A marcação de RECK mostrou uma distribuição perinuclear da proteína nas condições WT, vetor e RECK⁺ (Figura 11).

Figura 11: Localização subcelular de RECK. A proteína RECK foi marcada na linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) utilizando anticorpo primário anti-RECK e secundário goat anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488®. A marcação de RECK encontra-se predominantemente na região perinuclear. Barra = 20µm.

Como em Corrêa et al., 2010, a marcação dos filamentos de actina mostram que as condições WT e vetor apresentam células migratórias com evidentes redes de actina, formando os lamelipódios. As células RECK⁺ mostraram mais actina polimerizada na forma de fibras de estresse (Figura 12).

Figura 12: Citoesqueleto de actina. Os filamentos de actina foram marcados na linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) utilizando faloidina conjugada à rodamina. As condições WT e vetor apresentaram células migratórias com evidentes redes de actina formando os lamelipódios. Já as células RECK⁺ mostraram mais actina polimerizada na forma de fibras de estresse. Barra = 20μm.

A marcação com RhoA mostrou uma localização predominantemente nuclear, mais especificamente nos nucléolos. Não houve diferença entre as condições estudadas (Figura 13).

Figura 13: Localização subcelular de RhoA. A proteína RhoA foi marcada na linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) utilizando anticorpo primário anti-RhoA e secundário goat anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488[®]. A marcação de RhoA encontra-se predominantemente na região nuclear. Barra = 20µm.

A marcação com Rac1 mostrou uma localização mais acentuada ao redor do núcleo e nas regiões onde há a formação de protrusões membranares. Não houve diferença entre as condições estudadas (Figura 14).

Figura 14: Localização subcelular de Rac1. A proteína Rac1 foi marcada na linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) utilizando anticorpo primário anti-Rac1 e secundário goat anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488[®]. A marcação de Rac1 encontra-se mais acentuada ao redor do núcleo e nas regiões onde há a formação de protrusões membranares. Barra = 20µm.

A marcação com paxilina mostrou uma localização principalmente nas regiões de interação célula-matriz, sendo possível a visualização das adesões focais. Há um aumento no tamanho das adesões focais nas células RECK⁺ quando comparadas aos controles (Figura 15).

Figura 15: Localização subcelular de paxilina. A proteína paxilina foi marcada na linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) utilizando anticorpo primário anti-paxilina e secundário goat anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488[®]. A marcação de paxilina encontra-se principalmente nas adesões focais (seta). Barra = 20µm.

4.4. Ensaio de Zimografia para avaliar a atividade de MMP-2 e MMP-9

Mesmo com os resultados obtidos na tese de Doutorado da Dra Tatiana Caroline Silveira Corrêa mostrando que a super expressão de RECK não levou a uma mudança em relação à expressão e atividade das MMP-2 e MMP-9, foi realizado um único ensaio de zimografia buscando avaliar uma possível diferença na atividade das MMPs em baixa e em alta confluência.

Os resultados dos ensaios estão apresentados nas Figuras 16, 17 e 18. As células foram cultivadas durante 7 dias em colágeno tipo 1, sendo o sobrenadante coletado nos dias 3, 5 e 7.

Figura 16: Zimograma do sobrenadante após 3 dias de cultivo celular. BSA = meio de cultivo + 1% BSA; HT1080 = controle positivo; WT= T98G; vetor = T98G com pCXN2 sem o gene; RECK = T98G com o vetor contendo o gene *RECK*.

Figura 17: Zimograma do sobrenadante após 5 dias de cultivo celular. BSA = meio de cultivo + 1% BSA; HT1080 = controle positivo; WT= T98G; vetor = T98G com pCXN2 sem o gene; RECK = T98G com o vetor contendo o gene *RECK*.

Figura 18: Zimograma do sobrenadante após 7 dias de cultivo celular. BSA = meio de cultivo + 1% BSA; HT1080 = controle positivo; WT= T98G; vetor = T98G com pCXN2 sem o gene; RECK = T98G com o vetor contendo o gene *RECK*.

Através do ensaio de zimografia não foi possível observar diferença significativa na atividade das MMP-2 e MMP-9 quando a linhagem parental é comparada a condição RECK⁺, mesmo depois de 7 dias de cultura. A confluência parece afetar um pouco a atividade MMP-2, já que em alta confluência essa enzima parece ter uma atividade maior. As bandas referentes à MMP-2 são as maiores, pois sua expressão é constitutiva.

4.5. Ensaio gelatinolítico

Para avaliar a atividade das metaloproteinases totais foi realizado um ensaio gelatinolítico utilizando como substrato a DQTM-gelatina. O local onde houve degradação do substrato pode ser observado pela presença da fluorescência verde. No resultado do primeiro ensaio apresentado na Figura 19, houve uma degradação mais difusa nas condições WT e vetor. Nas células RECK⁺, a degradação foi mais perinuclear.

Figura 19: Ensaio gelatinolítico. Observação da degradação de DQTM-gelatina em cultura de célula da linhagem T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺).

4.6. Superexpressão de RECK com o vetor retroviral pLXSB em T98G

É sabido que a expressão exógena de proteínas pode levar a uma resposta que vai sendo alterada conforme a célula se adapta às novas condições, principalmente em vias que afetam a proliferação celular (Yoshida et al., 2011). Dessa forma, as células T98G foram infectadas com o vetor retroviral pLXSB-hRECK-FLAG para avaliar se alterações nas proteínas estudadas até o momento para as células com o vetor pCXN2-hRECK seriam uma resposta compensatória da célula, já que as células transfectadas com pCXN2 e pCXN2-hRECK utilizadas nesse estudo foram gerados à algum tempo. Para os ensaios foram utilizadas as células T98G, T98G-pLXSB (vetor) e T98G-pLXSB-hRECK (RECK⁺).

Inicialmente foi avaliada a expressão de RECK (Figura 20). A Figura 20 mostra que o ensaio funcionou, gerando células T98G que expressam RECK. Foram avaliadas também algumas proteínas estudadas para as células T98G-pCXN2-hRECK. Como o aumento na expressão de RECK pela densidade celular não se mostrou muito significativo, as proteínas foram avaliadas com as células somente em sub-confluência. Os resultados preliminares mostram que a fosforilação de ERK não foi alterada assim como a expressão de integrina β_1 . Já a fosforilação de FAK no sítio Tyr397 está um pouco diminuída.

Figura 20: Expressão protéica de RECK, integrina subunidade β_1 , Erk1/2 total e fosforilado, FAK total e fosforilado. Linhagem T98G (WT), T98G-pLXSB (vetor) e T98G-pLXSB-hRECK (RECK⁺). Quantificação relativa entre proteína/ α -tubulina ou proteína fosforilada/proteína total.

A atividade de Rac1 foi avaliada utilizando o ensaio de *pull-down* (Figura 21). A expressão de Rac total não é alterada, mas a atividade de Rac1 está aumentada em RECK⁺ em comparação com o vetor.

Figura 21: Avaliação da atividade de Rac1. Lisados do T98G-pLXSB (vetor) e de T98G-pLXSB-hRECK (RECK⁺) foram incubados com GST-PAK1-PBD (domínio de PAK1 que se liga à Rac1 fusionada com GST) para seleção das proteínas Rac1 ativas. O lisado total foi utilizado para obtenção de Rac total. As células RECK⁺ apresentaram aumento de proteínas Rac1 ativas quando comparado ao controle.

As adesões focais foram avaliadas pela co-marcação de paxilina e vinculina por imunocitoquímica. Na Figura 22, é possível observar que as células RECK⁺ apresentam um aumento no tamanho das adesões quando comparadas aos controles.

Figura 22: Localização subcelular de paxilina e vinculina. As proteínas paxilina e vinculina foram co-marcadas na linhagem T98G (WT), T98G-pLXSB (vetor) e T98G-pLXSB-hRECK (RECK⁺) utilizando anticorpo primário anti-paxilina e secundário goat anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488[®]; e anticorpo primário anti-vinculina e secundário goat anti-rabbit Texas Red[®]. A marcação de paxilina e vinculina encontra-se principalmente nas adesões focais (seta). Barra = 20µm.

Com essas células também foi iniciado a avaliação da atividade de EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico). EGFR é um receptor que se encontra na membrana da célula e é ativado quando seu substrato EGF (fator de crescimento epidérmico) se liga ao seu sítio ativo. A sinalização de EGFR é essencial em condições fisiológicas e patológicas. A ativação do receptor ativa uma cascata de sinalização que pode levar à proliferação, migração e diferenciação (Mitsudomi e Yabate, 2010). A desregulação dessa via por aumento na expressão de EGFR/EGF ou pela ativação constitutiva do receptor, geralmente causada por mutação, está associada a um prognóstico ruim em muitos cânceres humanos. As proteínas Ras-Raf-MAPK são a principal via de sinalização depois que EGFR é ativado (Lurge e Lenz, 2009).

Kitajima et al., 2010 reportou que a inibição de RECK por shRNA em MEFs causou um transiente aumento na via de EGFR e que o aumento na expressão de RECK em células de câncer de cólon levaram à uma continua diminuição na ativação dessa via, sugerindo que RECK é um novo modulador da via de EGFR.

A maioria dos gliomas apresenta mutação ou atividade aumentada de EGFR. Como a linhagem T98G não apresenta mutação em EGFR (dado obtido no Sanger COSMIC database para T98G), foi realizado um ensaio preliminar para avaliar a atividade de EGFR frente ao aumento na expressão de RECK na linhagem T98G (Figura 23). O resultado sugere que não há diferença entre as células RECK⁺ e os controles.

Figura 23: Avaliação da atividade de EGFR. Lisados da linhagem T98G (WT), T98G-pLXSB (vetor) e T98G-pLXSB-hRECK (RECK⁺) foram incubados o anticorpo anti-fosforilação de tirosina (pTyr) para seleção das proteínas fosforiladas no sítio de tirosina. As amostras incubadas com o anticorpo e o lisado total foram submetidos à eletroforese e transferidos para uma membrana de PVDF. EGFR fosforilado e EGFR foram identificados com o anticorpo anti-EGFR.

4.7. Superexpressão de RECK com o vetor retroviral pLXSB em U87

Foram iniciados ensaios de superexpressão de RECK na linhagem U87. Buscou-se estudar outra linhagem para avaliar se as alterações encontradas na linhagem T98G eram linhagem específica ou se aplicariam à outra linhagem de glioma.

A superexpressão de RECK na linhagem U87 foi realizada utilizando o vetor retroviral pLXSB e a confirmação da expressão protéica foi feita por Western Blot. Na Figura 24 é possível observar que a superexpressão funcionou, gerando células U87 que expressam RECK. Inicialmente foram avaliadas algumas proteínas estudadas para linhagem T98G. Como o aumento na expressão de RECK pela densidade celular não se mostrou muito significativo, as proteínas foram avaliadas com as células somente em sub-confluência. Os resultados preliminares (Figura 24) mostram que a expressão de integrina β_1 não foi alterada. Já a fosforilação de FAK no sítio Tyr397 e a fosforilação de ERK1/2 estão diminuídas.

Figura 24: Expressão protéica de RECK, integrina subunidade β_1 , Erk1/2 total e fosforilado, FAK total e fosforilado. U87-pLXSB (vetor) e U87-pLXSB-hRECK (RECK⁺). Quantificação relativa entre proteína/ α -tubulina ou proteína fosforilada/proteína total.

5. DISCUSSÃO

Os ensaios de Western Blot para as células T98G (WT), T98G-pCXN2 (vetor) e T98G-pCXN2-hRECK (RECK⁺) foram inicialmente realizados com as células em confluência baixa (70-80%) e alta (100%), pois segundo Hatta et al., 2009, o aumento na densidade celular leva a um aumento na expressão de RECK. Foi possível observar nas células RECK⁺ um aumento na expressão de RECK com o aumento da densidade celular.

Sendo assim, os ensaios de Western Blot foram realizados em células em baixa densidade celular e em alta densidade celular, buscando avaliar se o aumento na expressão de RECK levaria à diferença na expressão de alguma proteína. Foi observado um aumento/diminuição na fosforilação de algumas proteínas em relação à densidade celular, fato já descrito para várias proteínas como FAK (Batt e Roberts, 1998), ou um aumento/diminuição na expressão ou fosforilação na presença de RECK, mas não proporcionalmente à concentração de RECK presente. Por esse motivo, os ensaios realizados posteriormente, foram todos com células em sub-confluência.

Dentro do sistema nervoso central, já foram descritas a presença de pelo menos três subunidades de integrinas. As subunidades β_1 e α_v são expressas em uma grande variedade de tipos celulares incluindo neurônios, células da glia, células meníngeas e células endoteliais (Bellail et al., 2004). Integrinas que contêm a subunidade β_1 utilizam seu domínio intracelular para interagir com outras proteínas e formar as adesões focais. β_1 se associa com FAK e talina que junto com outras proteínas como Src, vinculina, paxilina e tensina se ligam aos filamentos de actina. Depois que RhoGTPases associadas são ativadas, os filamentos de actina se organizam, levando a formação das fibras de estresse e as integrinas tendem a aumentar o cluster. De forma contrária, a contínua ativação de FAK, por fosforilação mediada por Src ou por auto-fosforilação, parece reduzir RhoA, levando à quebra (*turnover*) da adesão focal (Raghavan et al., 2003).

Alguns trabalhos avaliando possíveis diferenças de expressão de integrinas, em tecidos normais e neoplásicos, mostram que há um aumento na expressão principalmente de β_1 e α_3 em células de gliomas quando comparadas às células normais (Paulus et al., 1993). O papel de β_1 nos gliomas vem sendo descrito como

fator chave, especialmente a integrina $\alpha_3\beta_1$, na regulação da migração celular, mostrando-se pró-invasor (D'Abaco e Kaye, 2007). Porém, nessa tese os resultados preliminares indicam que a subunidade β_1 está mais expressa na condição em que a migração e a invasão estão comprometidas, ou seja, quando RECK está superexpresso. Uma hipótese para esse fato, é que a possível diminuição da fosforilação de FAK diminui a quebra das adesões, fazendo com que mais integrinas que contêm a subunidade β_1 estejam presentes. A possível interação entre RECK e a subunidade β_1 foi relatada em um artigo de Miki et al., 2010, onde a perda da expressão de RECK causava uma diminuição na expressão de β_1 . As condições estudadas no artigo são bem diferentes das estudadas neste trabalho, mas é interessante saber que RECK pode ter influência sobre a expressão de β_1 e talvez de outras subunidades em modelo de glioma.

Mesmo a sinalização das integrinas em células neoplásicas e não-neoplásicas ser estudada extensamente nos últimos anos, ainda é difícil determinar sua função precisa na migração e invasão de células tumorais, muitas vezes parecendo ambígua. Um exemplo disso é a integrina $\alpha_2\beta_1$. Em alguns tipos tumorais essa integrina funciona como receptor que promove a migração e invasão das células, mas em outros casos, a sua presença leva à diminuição na invasão e restauração da diferenciação celular. Se essas discrepâncias são causadas por tipo celular, imortalização/seleção ou condições de cultivo celular ainda permanece incerto. Porém, muitos autores propõem que um fator importante para o efeito das integrinas é o estágio em que o tumor se encontra (Friedl e Bröcker, 2000; Raghavan et al., 2003; Guo e Giancotti, 2004).

O papel da subunidade β_1 parece ser tumor-específica ou até mesmo linhagem específica, visto que alguns trabalhos relatam que o aumento de β_1 em linhagens de glioma tem um papel pró-tumoral o que parece ocorrer ao contrário para a linhagem T98G transfectada com pCXN2-hRECK. Por isso, ensaios preliminares foram iniciados para a superexpressão de RECK na linhagem U87. A princípio, o efeito inicial da superexpressão de RECK não alterou a expressão de integrina β_1 . Porém, esse aumento de β_1 talvez esteja relacionado com uma adaptação da célula, uma vez que os resultados da expressão de β_1 na linhagem T98G recém-infectada pelo retrovírus pLXSB também não apresentou diferença significativa entre as condições estudadas.

A avaliação da fosforilação de FAK é muito importante, pois uma possível diminuição de sua expressão pode representar um perfil menos invasivo da célula. Porém, essa proteína não deve ser considerada como a principal alteração que levaria a modificação na motilidade celular, já que está relacionada tanto com a formação das adesões focais quanto com sua quebra, e também a outras funções como proliferação celular. FAK é uma proteína essencial na via das integrinas, mas seu papel é muito complexo devido aos vários eventos de sinalização envolvendo FAK e a sua posição única de quinase na transdução de múltiplos sinais em várias vias. FAK representa a parte central integrando informações de pelo menos quatro fontes: interações de integrinas com a matriz extracelular; sinalização gerada pelos receptores de fatores de crescimento; sinalização gerada por receptores acoplados a proteína-G; e forças mecânicas impostas na célula e transmitidas para o citoesqueleto (Schwack et al., 2010). Dessa forma, a avaliação de FAK é importante para auxiliar no desenho do possível mecanismo, mas não pode ser considerada a molécula chave. Contudo, a superexpressão de RECK tanto nas células T98G quanto nas células U87 mostram uma tendência de diminuição da fosforilação de FAK no sítio Tyr397, fato importante que será discutido a seguir.

As fosforilações de PTEN, Akt e ERK1/2 não apresentam diferença significativa quando comparadas entre a condição RECK⁺ e a linhagem parental T98G. Esse resultado é compatível com resultados não publicados obtidos pela Dra Tatiana Caroline Silveira Côrrea, em que não houve diferença significativa no ciclo celular, proliferação e senescência quando as condições vetor e RECK⁺ eram comparados aos controles. A diminuição da fosforilação de ERK1/2 observada em alta confluência celular provavelmente está relacionada com a diminuição da proliferação celular, devido ao alto número de células. Já foi relatado que as células da linhagem T98G quando em alta densidade celular param no ciclo celular, na fase G1 (Stein, 1979). Esse fato poderia levar a uma diminuição da fosforilação de ERK1/2, proteína esta relacionada com a ativação da transcrição de vários fatores que participam do controle do ciclo celular (Seger e Krebs, 1995).

ERK1/2 também foi estudado porque além de agir no núcleo, fosforilando vários fatores de transcrição e levando a eventos que favorecem a proliferação, ERK1/2 também pode agir de forma citoplasmática, fosforilando proteínas que vão agir em quinases ou proteínas do citoesqueleto. Como exemplos podem ser citados

a ativação de MLCK que regula a migração celular ou a inativação da adesão mediada por integrinas, ainda por um mecanismo desconhecido. Dessa forma, os substratos disponíveis para ERK1/2 ativo em um determinado tipo celular definem o papel dessa proteína (Ramos, 2008). Porém, acredita-se que os resultados obtidos com a superexpressão de RECK para a linhagem T98G não estão diretamente relacionados com a ativação de ERK1/2, já que não foi possível observar diferenças na sua fosforilação por Western Blot.

Apesar da fosforilação de ERK1/2 não ter um papel no efeito de RECK na linhagem T98G, esta proteína parece estar envolvida em possíveis alterações que a superexpressão de RECK possa causar na linhagem U87. A avaliação da fosforilação de ERK1/2 nas células U87-pLXSB-hRECK mostrou uma tendência de diminuição da ativação dessa proteína em relação ao controle. Essa diferença entre a linhagem T98G e U87 pode ser explicada pelo fato de U87 ter p53 selvagem e de T98G ter p53 mutado, sendo a linhagem U87 mais suscetível a alterações que envolvem proliferação celular. Porém, mais ensaios são necessários para confirmar esse fato.

A avaliação da atividade de RhoA e Rac1 mostraram resultados interessantes. Apesar das células T98G que superexpressam RECK apresentarem um aumento nas fibras de estresse e uma diminuição na presença de lamelipódios, os ensaios de *pull-down* mostraram um aumento na atividade de Rac1 sem alteração na atividade de RhoA. Não houve diferença na localização dessas proteínas como pôde ser observado pelo ensaio de imunocitoquímica. O que é interessante ressaltar desse ensaio é a alteração na localização de RhoA em relação ao que já vem sendo descrito em trabalhos mais antigos, que reportam a localização de RhoA no citoplasma e membrana. Porém, trabalhos recentes mostram que uma pequena fração de RhoA está no núcleo e em várias linhagens celulares tumorais, essa fração nuclear aumenta (Li et al., 2010; Dubash et al., 2011). Esse aumento de RhoA no núcleo foi observado na linhagem T98G. A marcação de RhoA por imunofluorescência mostrou predominância dessa proteína no núcleo, sendo acumulada nos nucléolos. A expressão de RECK nas células T98G não reverteu esse evento, se tornando visualmente ainda mais intensa, embora tenha que ser adequadamente quantificado por Western Blot. Ainda não se sabe ao certo qual o

papel de RhoA no núcleo, mas há trabalhos que sugerem um envolvimento com respostas de dano ao DNA (Dubash et al., 2011).

O aumento na atividade de Rac1 nas células T98G que expressam RECK foi observado tanto nas células transfectadas com pCXN2-hRECK quanto nas células infectadas com pLXSB-hRECK. Esse resultado mostrou-se um pouco contraditório, uma vez que uma das principais vias de ativação de Rac é através da fosforilação de FAK, levando à formação dos lamelipódios. A hipótese é que RECK inibe a quebra das adesões focais que participam do processo de migração, dificultando a mobilidade celular. Como as células continuam recebendo o estímulo para migrar, estas ativam Rac1 através de uma via independente de FAK. Para investigar esse fato, as células foram marcadas para paxilina para a visualização das adesões focais. Os resultados mostram um aumento no tamanho das adesões focais nas células RECK⁺, tanto nas transfectadas com pCXN2-hRECK quanto nas infectadas com pLXSB-hRECK. Uma das possibilidades para esse aumento no tamanho das adesões seria a diminuição na taxa de quebra (turnover) das adesões e o favorecimento da maturação dessas. A alteração nas adesões focais devido à expressão de RECK já havia sido descrito por Morioka et al., 2009, nos estudos com fibroblastos murinos. Além disso, o aumento nas adesões focais é compatível com o aumento das fibras de estresse, uma vez que essas adesões se encontram nas extremidades das fibras de estresse (Naumanen et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, a interação célula-matriz é importante para vários processos celulares, incluindo a migração celular. A migração polarizada das células envolve uma interação assimétrica entre a célula e o ambiente extracelular. As células que estão migrando formam e desfazem continuamente adesões na frente de migração. A quebra das adesões é controlada por várias vias de sinalização e pela modulação de forças de tensão. Inicialmente, a interação entre a célula e a matriz leva à formação de adesões nascentes que podem sofrer uma rápida desestruturação ou amadurecerem, formando as adesões focais (Broussard et al., 2008).

Os eventos que levam à quebra das adesões focais não estão totalmente elucidados. Porém, já se sabe que a protease calpaina, microtúbulos, FAK e dinamina participam da quebra das adesões focais durante a migração celular. A calpaina atua principalmente na parte posterior da célula, clivando proteínas que

fazem parte das adesões, como integrinas e talina. Os microtúbulos se estendem até as adesões e iniciam o processo de desestruturação. Durante o estágio final, a internalização das integrinas é mediada pela dinamina, proteína esta que é recrutada para as adesões focais através de FAK. Vários sinais como cálcio local, fosforilação de caveolina-1 e fosforilação de paxilina que aumentam a fosforilação de FAK no sítio Tyr397, aumentam a quebra das adesões (Tomar e Schlaepfer, 2009; Nagano et al., 2012). Chao e Kunz, 2009 mostraram que a quebra das adesões em células de fibrosarcoma HT1080 requerem a endocitose de integrinas $\beta 1$ ativas através de um processo dependente de clatrina e que envolve a proteína dinamina 2.

A diminuição da fosforilação de FAK observada para as células T98G pode estar relacionada com a diminuição na quebra das adesões, levando à diminuição na migração celular. Um possível mecanismo pelo qual RECK poderia influenciar a quebra das adesões seria pela endocitose das integrinas. Miki et al., 2007, mostrou que RECK pode influenciar as vias de endocitose de MT1-MMP e CD13; e Gálvez et al., 2002, demonstrou que MT1-MMP co-localiza com β_1 ou $\alpha_v\beta_3$, o que poderia levar a uma alteração na endocitose das integrinas mediada pela interação entre RECK e MT1-MMP. Essa hipótese será estudada para publicações futuras, assim como a ação de RECK em outras moléculas que estão envolvidas nas quebras das adesões.

Ensaio prévios avaliando o possível efeito de RECK na atividade do receptor EGFR não apresentaram resultados significativos. Além da atividade de EGFR nas células RECK⁺ não mostrar diferença quando comparado aos controles, a atividade de Ras, uma das moléculas que participam da principal via ativada por EGFR, também não parece estar alterada. Dessa forma, a via de EGFR não parece estar envolvida com os efeitos observados pela superexpressão de RECK na linhagem T98G. Porém, essa via pode estar envolvida nos efeitos de RECK na linhagem U87, uma vez que foi observado uma alteração na fosforilação de ERK1/2, molécula esta que faz parte da via de Ras.

Conclusões

- A superexpressão de RECK na linhagem T98G leva ao aumento no tamanho das adesões focais.
- Aumento na atividade de Rac1 nas células T98G que superexpressam RECK.
- Diminuição na fosforilação de FAK no sítio Tyr397 nas células T98G que superexpressam RECK.
- A densidade celular influencia a expressão de RECK e fosforilação de FAK.
- Na linhagem T98G, a expressão de RhoA localiza-se predominantemente no núcleo.

6. REFERÊNCIAS

- BATT, D.B., ROBERTS, T.M. Cell Density Modulates Protein-tyrosine Phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.6, p.3408-3414, 1998.
- BEHMER, O. A., TOLOSA, E. M. C., FREITAS NETO, A. G. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. São Paulo: Edart, p. 315, 1976.
- BELLAIL, A.C., HUNTER, S.B., BRAT, D.J., TAN, C., VAN MEIR, E.G. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.1046-1069, 2004.
- BERENS, M.E., GIESE, A. "...those left behind." Biology and Oncology of Invasive Glioma Cells. **Neoplasia**, v.1, n.3, p.208-219, 1999.
- BERRIER, A.L., YAMADA, K.M. Cell-Matrix Adhesion. **J. Cell. Physiol.**, v.213, p.565-573, 2007.
- BODENSTINE, T.M. e WELCH, D.R. Metastasis Suppressors and the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenvironment**, v.1, p.1-11, 2008.
- BRAKEBUSCH, C., FÄSSLER, R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. **The EMBO Journal**, v.22, n.10, p.2324-2333, 2003.
- BROUSSARD, J.A., WEBB, D.J., KAVERINA, I. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v.20, p.85-90, 2008.
- CARY, L.A., GUAN, J-L. Focal adhesion kinase in intergrin-mediated signaling. **Frontiers in Bioscience**, v.4, p.d102-113, 1999.
- CHAO, W-T., KUNZ, J. Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. **FEBS Letter**, v.583, n.8, p.1337-1343, 2009.
- CORRÊA, T.C.S., BROHEM, C.A., WINNISCHOFER, S.M.B., DA SILVA CARDEAL, L.B., 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. **J. Cell. Biochem.** v. 99, p.156–167, 2006.

- CORRÊA, T.C.S., MASSARO, R.R., BROHEM, C.A., TABOGA, S.R., LAMERS, M.L., DOS SANTOS, M.F., MARIA-ENGLER, S.S. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.110, p.52-61, 2010.
- CLAES, A., IDEMA, A.J., WESSELI, P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. **Acta Neuropathol**, v.114, p.443-458, 2007.
- D'ABACO, G.M., KAYE, A.H. Integrins: Molecular determinants of glioma invasion. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.14, p.1041-1048, 2007.
- DECLERK, Y.A., MERCURIO, A.M., STACK, M.S., CHAPMAN, H.A., ZUTTER, M.M., MUSCHEL, R.J., RAZ, A., MATRISIAN, L.M., SLOANE, B.F., NOEL, A., HENDRIX, M.J., COUSSENS, L., PADARATHSINGH, M. Proteases, Extracellular Matrix and Cancer: A Workshop of the Path B Study Section. **American Journal of Pathology**, v.164, n.4, 2004.
- DUBASH, A.D., GUILLUY, C., SROUGI, M.C., BOULTER, E., BURRIDGE, K., GARCÍA-MATA, R. The Small GTPases RhoA Localizes to the Nucleus and Is Activated by Net1 and DNA Damage Signals. **PLoS ONE**, v.6, n.2, e17380, 2011.
- FRIEDL, P., BRÖCKER, E.B., The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, p.41-64, 2000.
- GÁLVEZ, B.G., MATÍAS-ROMÁN, S., YÁÑEZ-MÓ, M., SÁNCHEZ-MADRID, F., ARROYO, A.G. ECM regulates MT1-MMP localization with $\beta 1$ or $\alpha v \beta 3$ integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. **The Journal of Cell Biology**, v.159, n.3, p.509-521, 2002.
- GLADSON, C.L. The Extracellular Matrix of Gliomas: Modulation of Cell Function. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.58, p. 1029-1040, 1999.
- GLADSON, C.L., PRAYSON, R.A., LIU, M. The Pathobiology of Glioma Tumors. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v.5, p.33-50, 2010.
- GOLDBRUNNER, R.H., BERNSTEIN, J.J., TONN, J.-C. Cell-Extracellular Matrix Interaction in Glioma Invasion. **Acta Neurochir (Wien)**, v.141, p.295-305, 1999.
- GONDI, C.S., LAKKA, S.S., DINH, D.H., OLIVERO, W.C., GUJRATI, M., RAO, J.S. Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA

- (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth. **Neuron Glia Biol**, v.1, n.2, p165-176, May 2004.
- GUO, W., GIANCOTTI, F.G. Integrin signaling during tumour progression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.5, p.816-826, 2004.
- HARBURGER, D.S., CALDERWOOD, D.A. Integrin signalling at a glance. **Journal of Cell Science**, v.122, p.158-163, 2009.
- HATTA, M., MATSUZAKI, T., MORIOKA, Y., YOSHIDA, Y., NODA, M. Density- and serum-dependent regulation of the Reck tumor suppressor in mouse embryo fibroblasts. **Cellular Signalling**, v.21, p.1885-1893, 2009.
- HUSE, J.T., HOLLAND, E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, v.10, p319-331, 2010.
- IDEN, S., COLLARD, J.G. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.11, p.846-859, 2008.
- KITAJIMA, S., MIKI, T., TAKEGAMI, Y., KIDO, Y., NODA, M., HARA, E., SHAMMA, A., TAKAHASHI, C. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. **Oncogene**, p.1-14, 2010.
- LE MERCIER, M., FORTIN, S., MATHIEU, V., KISS, R., LEFRANC, F. Galectins and Gliomas. **Brain Pathology**, ISSN 1015-6305, p.1-11, 2009.
- LEGATE, K.R., WICKSTRÖM, S.A., FÄSSLER, R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signalling. **Genes & Development**, v.23, p.397-418, 2010.
- LI, Y., CHEN, Y., TAO, Y., XU, J., CHEN, M. RhoA protein is generally distributed in the nuclei of cancer cells. **Oncology Reports**, v.24, p.1005-1009, 2010.
- LIANG, C-C., PARK, A.Y., GUAN, J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v.2, n.2, p.329-333, 2007.

- LOCHTER, A., SREBROW, A., SYMPSON, C.J., TERRACIO, N., WERB, Z., BISSEL, M.J. Misregulation of Stromelysin-1 Expression in Mouse Mammary Tumor Cells Accompanies Acquisition of Stromelysin-1-dependent Invasive Properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.8, p.5007-5015, 1997.
- LOUIS, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu. Rev. Pathol.**, v.1, p.97–117, 2006.
- LURJE, G., LENZ, H.J. EGFR Signaling and Drug Discovery. **Oncology**, v.77, p.400-410, 2009.
- MAREEL, M., LEROY, A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol Rev.**, v.83, n.2, p.337-76, 2003.
- MARIA, S. S., WADA, M. L. F. Cytochemical analysis of Vero cells on collagen gel in long term culture. **In vitro Cell Dev Biol-Animal**, v. 33, n.10, p.748-750, 1996.
- MCLEAN, G.W., CARRAGHER, N.O., AVIZIENYTE, E., EVANS, J., BRUNTON, V.G., FRAME, M.C. The role of focal-adhesion kinase in cancer – a new therapeutic opportunity. **Nat. Rev. Cancer**, v.5, n.7, p.505-515, 2005.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. Práticas em Biologia Celular. Edgard Blücher, SP, 71p, 1980.
- MENG, N., LI, Y., ZHANG, H., SUN, X-F. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histol Histopathol**, v. 23, p.1003-1010, 2008.
- MIKI, T., TAKEGAMI, Y., OKAWA, K., MURAGUCHI, T., NODA, M., TAKAHASHI, C. The Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs (RECK) Interacts with Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase and CD13/Aminopeptidase N and Modulates Their Endocytic Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.16, p.12341-12352, 2007.
- MIKI, T., SHAMMA, A., KITAJIMA, S., TAKEGAMI, Y., NODA, M., NAKASHIMA, Y., WATANABE, K., TAKAHASHI, C. The beta1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. **Mol. Cancer Res.**, v.8, n.5, p.665-676, 2010.
- MITSUDOMI, T., YATABE, Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. **FEBS Journal**, v.277, p.301-308, 2010.

- MORIOKA, Y., MONYPENNY, J., MATSUZAKI, T., SHI, S., ALEXANDER, D.B., KITAYAMA, H., NODA, M. The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. **Oncogene**, v.28, p.1454-1464, 2009.
- MUELLER, M.M, FUSENIG, N.E. Friends or foes – Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.839-849, 2004.
- NAGANO, M., HOSHINO, D., KOSHIKAWA, N., AKIZAWA, T., SEIKI, M. Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration. **International Journal of Cell Biology**, v.2012, ID 310616, 10 páginas, 2012.
- NAKADA, M., NAKADA, S., DEMUTH, T., TRAN, N.L., HOELZINGER, D.B., BERENS, M.E. Molecular targets of glioma invasion. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.64, p.458-478, 2007.
- NAKAGAWA, T., KUBOTA, T., KABUTO, M., FUJIMOTO, N., OKADA, Y. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase/type IV collagenase = gelatinase 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.
- NAUMANEN, P., LAPPALAINEN, P., HOTULAINEN, P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. **Journal of Microscopy**, v.231, Pt 3, p.446-454, 2008.
- NODA, M., OH, J., TAKAHASHI, R., KONDO, S., KITAYAMA, H., TAKAHASHI, C. RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, p.167–175, 2003.
- NODA, M., TAKAHASHI, C., MATSUZAKI, T., KITAYAMA, H. What we learn from transformation suppressor genes: lessons from RECK. **Future Oncol.**, v.6, n.7, p.1105-1116, 2010.
- PARSONS, J.T., MARTIN, K.H., SLACK, J.K., TAYLOR, J.M., WEED, S.A. Focal Adhesion Kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell. **Oncogene**, v.19, p.5606-5613, 2000.

- PAULUS, W., BAUR, I., SCHUPPAN, D., ROGGENDORF, W. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. **American Journal of Pathology**, v.143, n.1, 1993.
- RAGHAVAN, S., VAEZI, A., FUCHS, E. A Role for $\alpha\beta 1$ Integrins in Focal Adhesion Function. **Developmental Cell**, v.5, p.415-427, 2003.
- RAMOS, J.W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p.2707-2719, 2008.
- REIS, S.T., PONTES-JUNIOR, J., ANTUNES, A.A., DE SOUSA-CANAVEZ, J.M., DALL'OGGIO, M.F., PASSEROTTI, C.C., ABE, D.K., CRIPPA, A., DA CRUZ, J.A., TIMOSZCZUK, L.M., SROUGI, M., LEITE, K.R. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. **Int J Biol Markers**, v. 26, n.4, p. 255-261, 2011.
- RUOSLAHTI, E. Brain extracellular matrix. **Glycobiology**, v.6, n.5, p.489-492, 1996.
- SASAHARA, R.M., TAKAHASHI, C., NODA, M. Involvement of the Sp1 Site in ras-Mediated Downregulation of the RECK Metastasis Suppressor Gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.264, p.668-675, 1999.
- SCHOENWAEELDER, S.M., BURRIDGE, K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. **Current Opinion in Cell Biology**, v.11, p.274-286, 1999.
- SEGER, R., KREBS, E.C. The MAPK signaling cascade. **The FASEB Journal**, v.9, p.726-735, 1995.
- STEIN, G.H. T98G: An Anchorage-independent Human Tumor Cell Line that Exhibits Stationary Phase G1 Arrest In Vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v.99, p.43-54, 1979.
- STENZINGER, A., VON WINTERFELD, M., RABIEN, A., WARTH, A., KAMPHUES, C., DIETEL, M., WEICHERT, W., KLAUSCHEN, F., WITTSCHIEBER, D. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif (RECK) expression: an independent prognostic marker of survival in colorectal cancer. **Human Pathology**, doi: 10.1016/j.humpath.2011.10.012, 2012.

- STYLLI, S.S., KAYE, A.H., LOCK, P. Invadopodia: At the cutting edge of tumour invasion. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.15, p.725-737, 2008.
- TAMURA, M., GU, J., TRAN, H., YAMADA, K.M. PTEN Gene and Integrin Signaling in Cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v.91, n.21, p.1820-1828, 1999.
- TAKAGI, S., SIMIZU, S., OSADA, H. RECK Negatively Regulates Matrix Metalloproteinase-9 Transcription. **Cancer Res**, v.69, n.4, p.1502-1508, 2009.
- TAKAHASHI, C., SHENG, Z., HORAN, T.P., KITAYAMA, H., MAKI, M., HITOMI, K., KITaura, Y., TAKAI, S., SASAHARA, R.M., HORIMOTO, A., IKAWA, Y., RATZKIN, B.J., ARAKAWA, T., NODA, M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.22, p. 13221-13226, 1998.
- TAKEUCHI, T., HISANAGA, M., NAGAO, M., IKEDA, N., FUJII, H., KOYAMA, F., MUKOGAWA, T., MATSUMOTO, H., KONDO, S., TAKAHASHI, C., NODA, M., NAKAJIMA Y. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.10, n.16, p.5572-5579, 2004.
- TOMAR, A., SCHLAEPFER, D.D. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. **Current Opinion in Cell Biology**, v.21, n.5, p.676-683, 2009.
- VEGA, F., RIDLEY, A.J. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Letters**, n.582, p.2093-2101, 2008.
- WEN, P.Y, KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. **The New England Journal of Medicine**, v.359, n.5, p.492-507, 2008.
- YAMADA, K.M., AKARI, M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. **Journal of Cell Science**, v.114, n.13, p. 2375-2382, 2001.
- YOSHIDA, Y., NINOMIYA, K., HAMADA, H., NODA, M. Involvement of SKP2-p27^{KIP1} pathway in suppression of cancer cell proliferation by RECK. **Oncogene**. doi: 10.1038/onc.2011.570.
- YUE, Z., SHAOGIANG, C., GUOGIANG, Z., WENJIE, M., YANG, L., RUI, Z., QINGYUAN, Z., DA, P. Low expression of RECK indicates a shorter survival for

- patients with invasive breast câncer. **Cancer Science**. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02265.x, 2012.
- ZAMECNIK, J. The extracellular space and matrix of gliomas. **Acta Neuropathol.**, v.110, p.435-442, 2005.
- ZHAO, J., GUAN, J-L. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v.28, p.35-49, 2009.
- ZIGRINO, P., LÖFFEK, S., MAUCH, C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. **Biochimie**, v.87, p.321-328, 2005.
- Sanger Cosmic Database, The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). In: **Trust Sanger Institute**. Disponível em: http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=genes_without&sample_id=897444 Acesso: 25 de setembro de 2011.

Molecular Targets: Inhibition of Tumor Cell Invasion

Raquel Brandão Haga and Silvya Stuchi Maria-Engler*
*Department of Clinical Chemistry and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences,
University of São Paulo
Brazil*

1. Introduction

Gliomas are solid brain tumors that arise from glial cells. According to World Health Organization (WHO), they are classified in four grades based in their histological features. Grades I and II are considered low-grade gliomas and grades III and IV, malignant gliomas. In the United States, each year more than 22,000 people are diagnosed with malignant glioma, representing almost 70% of all malignant primary brain tumors in adults (Wen & Kesari, 2008; CBTRUS 2010; Jones & Holland, 2010).

Despite years of research, mortality rates are still high for patients diagnosed with malignant gliomas. Glioblastoma multiforme (WHO grade IV) is the most frequent malignant brain tumor in adults. Even with heavy treatment that includes surgery, radiotherapy and adjuvant chemotherapy, the median survival remains in the range of 12-15 months for patients with this type of tumor (Minniti et al., 2009; Jones & Holland, 2010).

Glioblastomas are separated in two main subtypes: primary glioblastomas and secondary glioblastomas. Primary glioblastoma affects preferentially patients older than 50 years old and has genetic alterations as epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification and mutation, loss of heterozygosity of chromosome 10q, deletion of the phosphatase and tensin homologue on chromosome 10 (PTEN), and p16 deletion. Secondary glioblastoma starts as low-grade or anaplastic astrocytomas in younger patients and progresses to glioblastoma over the years. Its main alterations involve mutations in *TP53*, overexpression of platelet derived growth factor receptor (PDGFR), changes in p16 and retinoblastoma pathways, and loss of heterozygosity of chromosome 10q. Even morphologically similar, primary and secondary glioblastomas may differ in their response to molecular targeted therapy (Wen & Kesari, 2008).

1.1 Current treatment

Choosing the best treatment depends on the type of tumor, position in the brain, its size and its grade. For patients newly diagnosed with brain malignancies, the current standard treatment protocols include maximally surgical resection, followed by chemotherapy concomitant to fractionated radiation therapy of the tumor. Adjuvant chemotherapy for

* Corresponding Author

glioblastomas is based on alkylating agents-based as temozolomide (TMZ) or carmustine wafers (Gliadel®), the latter being inserted in the surgery cavity during operation (Argyriou et al., 2009; Minniti et al., 2009). TMZ is a second-generation imidazotetrazine derivative and its cytotoxic effects are caused by the methylation of specific DNA site as O_6 position of guanine. In recurrent tumors some patients undergo reoperation. The chemotherapy used in this case is carmustine wafers (Gliadel®), conventional therapy as lomustine, PCV and carboplatin, bevacizumab plus irinotecan, and experimental therapies (Wen & Kesari, 2008). Although these treatments are well established, they are still just palliative and not curative in almost all cases.

The failure in malignant glioma treatment is due multiple causes that include invasive nature of glioma cells, resistance to radiotherapy and chemotherapy, and presence of the blood brain barrier (Figure 1).

Fig. 1. Causes of resistance to current treatments. MDR = multidrug resistance.

1.2 Resistance

Resistance is a current problem in the treatment of almost all cancers, and in glioma this would not be different. Malignant gliomas have some characteristics that make them especially difficult to treat. Due to the diffuse nature of gliomas, they should not be considered a local disease. This feature limits the effectiveness of local therapeutic approaches, as surgery (Goldbrunner et al., 1999). Other important factors are the presence of the blood brain barrier (BBB) and the inter- and intratumor heterogeneity which lead to fail in radio and chemotherapies (Jones & Holland).

Combination of chemotherapy with radiation has improved a little the patient survival. However, these results are still very far from providing an effective treatment. Multidrug

resistance (MDR) is one of the reasons for the poor response to standard treatments. MDR is a characteristic of cancer cells where these cells are resistant to an abroad spectrum of drugs with different modes of action. The mechanisms of chemoresistance are complex and multifactorial; and can be separated in intrinsic resistance or acquired resistance. The intrinsic resistance is present at the beginning of the treatment. The drug-resistant cells already express one or more resistance-mediating proteins or pathways. The acquired resistance is the resistance that is developed during the treatment. The three major mechanisms of drug resistance in cells are related to decreased uptake, especially for drugs that need transporters to enter the cell; changes in the cell regarding cell cycle, DNA-damage repair, apoptosis and drug metabolism, leading to alteration in the cytotoxicity of some drugs; and increase in the energy demanding to hydrophobic drugs to enter the cell caused by the activity of drug pumps as the ATP-binding cassette (ABC) transporters (Szakács et al., 2006; Lage, 2008; Lu & Shervington, 2008).

An important type of cell involved in malignant glioma resistance is the cancer stem cell. Although stem cells represent just a small part of the cells within malignant gliomas, it seems that they have an important role in the resistance to standard treatments, being radioresistant and chemoresistant (Adamson et al., 2009; Huang et al., 2010; Huse & Holland, 2010; Lamszus & Günther, 2010). Cancer stem cells are more resistant to radiation when compared to non-stem glioma cells. Radioresistance is due to the activation of pathways involved in DNA damage checkpoint response, leading to a more efficient DNA damage repair and a more rapidly recover from genotoxic stress. Radiotherapy affects tumor cells preferentially through DNA damage. For that reason, damage checkpoint responses are essential to radiosensitivity in cells. Chemoresistance in stem cells is probably caused by enhanced expression of BCRP1 and O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) as well as anti-apoptosis proteins. The ABC transporter BCRP1 has been playing an important role in drug resistance of normal and tumor stem cells while the presence of MGMT which is a DNA repair protein protects tumor cells against alkylating chemotherapeutic agents, such as TMZ (Bao et al., 2006; Liu et al., 2006; Wen & Kesari, 2008; Van Meir et al., 2010).

The use of chemotherapy is also limited due to the presence of the blood brain barrier (BBB). It restricts the action of conventional drugs that have difficulty to reach their therapeutic concentrations into the tumor and peritumor area. Only highly hydrophobic and low-molecular weight molecules are able to penetrate into the brain and reach their targets. There have been several attempts to improve drug delivery and increase its local concentration as intra-arterial delivery or opening the BBB using analogs of bradykinin (RMP-7). However, none has shown great result (Giese et al, 2003; Argyriou et al., 2009).

Apart from mechanisms of resistance described above, most of the treatments fail because of the highly invasive nature of glioma cells. Groups of cells or single cells can detach from the main tumor mass and invade long distances. The capacity of glioma cells to penetrate within the normal brain brings great clinical challenges because the remaining cells are believed to be responsible for tumor recurrence after standard treatments. The image methods available are not able to track these cells and it is not known the proportion of migratory cells affected by the current therapy (Berens & Giese, 1999; Claes et al., 2007). Another challenge in targeting the remaining cells is redundancy in the signaling pathways that lead to cell motility. Nowadays there are a lot of studies involving targets that are unique of brain ECM,

cell surface receptors, and signaling molecules activated in migrating cells. These include tenascin C, brevican, Src family of non receptor tyrosine kinases, Rho family of small GTPases, glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), and integrins. The highly complex promigratory signaling, the influence of microenvironment, and the unique nature of the invasive process in the brain provide an extensive area of study for the next years (Van Mer et al., 2010). This review focuses on the mechanisms involved in glioma cell migration and the potential molecular targets within these pathways.

2. Glioma invasion and microenvironment

Invasion is a characteristic not exclusive for malignant gliomas. Low-grade astrocytomas can also show extensive infiltration of normal brain, limiting resection and eventually leading to recurrence and progression of the disease. However, the dynamic of high-grade glioma invasion seems to be more rapid (Giese et al., 2003; Louis, 2006; Jones & Holland, 2010). Although this type of tumor is extremely invasive, metastasis out of the brain is rare. Invasive cells tend to follow existing anatomical structures, and migrate along myelinated fiber tracts as corpus callosum, meninges and the ventricular lining and the perivascular regions (Tysnes & Mahesparan, 2001).

The invasive nature of glioma cells is one of the major problems of this type of cancer. After resection of the main tumor, the residual pool of invasive cells gives rise to recurrent tumor. Interaction between cells and extracellular matrix (ECM) is the main factor to maintain the normal features of tissues. The loss of ECM control is a hallmark in tumor progression toward invasion. Although brain tumor cells share common invasive characteristics with other tumor cell types, the different composition of the brain ECM suggests alternative invasive mechanisms for brain tumor cells. This unique brain ECM composition may also be one of the reasons for the poorly metastatic behavior even though the cells are highly invasive (Tysnes & Mahesparan, 2001). The human brain ECM consists mainly of glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans. The four main GAGs are hyaluronic acid, chondroitin sulfate, keratan sulfate and heparin sulfate. The presence of glycoproteins as fibronectin or collagen, are limited. The interaction between GAG hyaluron and the other GAGs or glycoproteins forms a loose ECM-meshwork around axons, neurons, and glial cells of the white and gray matter (Goldbrunner et al., 1998).

Invasion is a complex and dynamic process that has three basic coordinated steps: adhesion to the ECM, cytoskeleton rearrangement, and degradation of ECM components (Figure 2). Cells have to interact with their microenvironment to be able to migrate and invade. Integrins together with CD44 receptor are the receptors responsible for glioma cells-ECM adhesions. Migrating cells interact with ECM components forming transition adhesions which will have two main functions: generate signals that lead to cytoskeletal rearrangement and support cell traction. Cells also need space to migrate and ECM proteolysis is accomplished by activation of several proteases such as matrix metalloproteinases (MMPs) and plasmin secreted by glioma cells and endothelial cells. Cytoskeletal rearrangements lead to cell polarization and formation of membrane protrusion for which RhoGTPase family plays a major role. Cells invade by actively migrating into the newly created space (Goldbrunner et al., 1999; Bellail et al., 2004; Teodorczyk & Martin-Villalba, 2010).

Fig. 2. The three components related to the invasion process. Membrane receptors as integrins and CD44 receptor are responsible for the cell-ECM interaction. Actin filaments are important cytoskeleton structures that rearrange to allow cell to migrate. Proteases as matrix metalloproteinases (MMPs) degrade ECM components and open space to cell migration.

2.1 ECM components

It is known that some ECM components are upregulated within tumor stroma and within brain parenchyma surrounding tumor area. Among them are hyaluronan, vitronectin, osteopontin, tenascin-C, SPARC and BEHAB (Bellail et al., 2004).

Hyaluronan (HA) is a glycosaminoglycan and the major component of brain ECM. In normal ECM, HA is responsible for tissue homeostasis, biomechanical integrity, and tissue structure. However, in malignant tumor tissue, it has been shown that HA facilitates primary brain tumor invasion *in vivo* and migration *in vitro* through its two receptors, CD44 and receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) (Bellail et al., 2004; Park et al., 2008). The mechanisms of action are not completely elucidated but there are some evidences showing that HA induces tumor progression through pathways as PI3K/Akt/mTor/osteopontin and RhoGTPase signaling (Kim et al., 2005; Bourguignon, 2008).

Tenascin-C is a large modular glycoprotein. Tenascin-C signaling is mediated by integrin $\beta 1$ via phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK). It has been shown that tenascin-C is overexpressed in invasive glioma *in vivo* (Demuth & Berens, 2004).

BEHAB (brain-enriched hyaluronan-binding) protein, also known as brevican, is a chondroitin sulfate lectican. Its expression in the brain is very low being up-regulated in malignant gliomas. Its high expression and cleavage promote glioma invasion. Cleavage of BEHAB is mediated by metalloproteases of ADAMTs family (Gladson, 1999; Bellail et al., 2004; Viapiano et al., 2008).

2.2 Interaction with the ECM

Integrins are a family of transmembrane glycoprotein receptors. They are heterodimers and consist of α and β subunits non-covalently associated. To date there have been described 18

α subunits and 8 β subunits combining to form 24 integrins that bind to different ECM components. Some integrins are ubiquitously expressed while others depend on the tissue or stage of development (Brakebusch & Fässler, 2003; Berrier & Yamada, 2007). The interaction between integrins and ECM components activates a number of signaling pathways that control proliferation, differentiation, migration, and cell survival. Changes in both integrin and ECM molecules expression may cause important cell modifications contributing to malignant progression (Gladson, 1999).

Integrins are the main connection between ECM and cytoskeleton. When integrin binds its ligands, actin filaments and signaling proteins move to integrin's cytoplasmic domain and form focal complexes. These complexes can grow in size and stabilize to form focal contacts or remain as focal complexes. Focal contacts are more mature and stable adhesions, usually found in the end of actin bundle called stress fibers. Focal complexes are less persistent cellular structures and suffer rapid turnover (Schoenwaelder & Burridge, 1999; Brakebusch & Fässler, 2003; Demuth & Berens, 2004).

Within Central Nervous System it has been described the presence of at least three integrin subunits. Subunits β_1 and α_v are described in a variety of cell types including neurons, glia cells, meningeal cells and endothelial cells. It has been reported differences in integrin expression in glioma cells. Subunits β_1 and α_3 are higher expressed in glioma cells when compared with normal cells and β_1 is being considered a key factor in glioma cell migration (Paulus & Tonn, 1994; Bellail et al., 2004; D'Abaco & Kaye, 2007).

CD44 receptor binds hyaluronic acid, one of the main brain ECM components. It is expressed in a variety of cells, including glial cells. Alternative mRNA splicing form several isoforms of CD44, being isoform CD44H the most important in normal brain as well as in primary brain tumor, including glioblastomas (Goldbrunner et al., 1998).

CD44 functions as both receptor and signaling molecule to induce cell migration and invasion through activation of actin reorganization pathways. As receptor, CD44 binds to HA and activates pathways described above. In tumor cells, CD44 is proteolytically cleavage at the extracellular domain by MMPs and CD44 cleavage is also important for CD44-mediated tumor cell migration. Engagement of CD44 augments CD44 cleavage by Rac activation (Murai et al., 2004; Teodorczyk & Martin-Villalba, 2010).

2.3 ECM proteolysis

Proteases are enzymes that cleave ECM components. They are secreted by glioma cells and seem to play an important role in cell migration. The most studied proteases are matrix metalloproteinases (MMPs) and the serine protease urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor. The role of these enzymes in glioma invasion is complex, since low-grade glioma invades the surrounding normal brain, even with normal level of the proteases (Louis, 2006; Drappatz et al., 2009).

MMPs are a family of zinc-dependent proteases. They are generally classified in four groups: collagenases, gelatinases, membrane-type MMPs (MT-MMPs) and stromelysins. The mechanisms that control MMP expression are not completely clear but some studies showed that MMPs can be regulated by ECM components, growth factors and cytokines. All MMPs are secreted as inactive proenzymes that need proteolytic cleavage for activation. The

proteolytic effect of MMPs is balanced by MMPs inhibitors as tissue-derived inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). TIMPs bind to the active zinc-binding site of the MMP protein, forming an inactive complex. In malignant gliomas, there is an imbalance between expression of MMPs and their corresponding inhibitors which leads to a higher activity of MMPs and consequently greater ECM proteolysis (Newton, 2004).

uPA is secreted as a soluble protein and binds to its receptor (uPAR), a GPI-anchored protein. uPA is often up-regulated in malignant brain tumors and its activity is high at the edge of these tumors. Binding between this protease and its receptor is necessary for the activation of plasmin which can degrade ECM components. In 2003, Chandrasekar et al. reported that downregulation of uPA could inhibit glioblastoma cell migration and PI3K/Akt signaling *in vitro*. These results show the important role of uPA in glioma cell migration.

2.4 Cytoskeleton rearrangement

Directional cell migration undergoes a series of cytoskeletal reorganizations to create a leading edge and a trailing edge. At the leading edge there is the formation of membrane protrusions and the establishment of new matrix contacts, while at the trailing edge cell adhesions are disassembled to allow cells to move forward. Active remodeling of actin cytoskeleton is required to form structures at the front of the cell such as filopodia and lamellipodia. These structures have several actin filaments (F-actin) that are polymerized or depolymerized by the addition of G-actin at their barbed end or the release of G-actin at their pointed end. Cytoskeleton rearrangement depends on complex signaling pathways and is controlled mainly by the activation/deactivation of proteins from the Rho family of small GTPases (Berrier & Yamada, 2007; Wehrle-Haller & Imhof, 2003).

The Rho family of small GTPases has more than 20 members, including the well known proteins Cdc42, Rac and Rho. These proteins, as all small GTPases, cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state. The activation and deactivation of Rho proteins are mediated by guanine nucleotide-exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs), respectively. There have been more than 70 RhoGTPase effector proteins described. The temporal and spatial balance between the different RhoGTPases are very important for the cellular processes. To promote cell migration, Rho protein activation is related to formation of focal adhesion complexes and stress fiber (bundle of actin filaments), while Rac and Cdc42 are associated with lamellipodia and filopodia formation, respectively (Iden & Collard, 2008).

2.5 Growth factors and other molecules

Overexpression of growth factor receptors and their ligands is very common in gliomas. Some growth factor receptors have been involved in glioma cell migration and invasion. Among these growth factor receptors are c-Met, epidermal growth factor receptor (EGFR) and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) (Gladson et al., 2010).

In particular, EGFR has been shown to be important for tumor growth and invasion (Tysnes & Mahesparan, 2001). Amplification and overexpression of EGFR are observed in 50% of glioblastoma multiforme. Malignant gliomas can also express a mutant receptor that is ligand independent, EGFRvIII. This receptor is constitutively phosphorylated and is more

tumorigenic than the wild-type receptor (Nakada et al., 2007). Activation of EGFR leads to signaling complex formation which initiates downstream signaling cascades, including the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). These pathways regulate several cellular responses (Huang et al., 2009).

Platelet-derived growth factor (PDGF) is another growth factor that is upregulated in gliomas. Although PDGF is more related to proliferation and angiogenesis, some works have shown the influence of PDGF in cell motility in gliomas (Hoelzinger et al., 2007).

Transforming growth factor β (TGF- β) is present in tumor microenvironment and is secreted by malignant cells. This molecule can regulate cell motility, invasion, immune surveillance and angiogenesis. In glioblastoma multiforme, it has been reported the presence of TGF- β in tumor environment (Barcellos-Hoff et al., 2009; Drappatz et al., 2009).

Chemokines are small chemoattractant cytokines. These molecules and their receptors are expressed into the central nervous system by neurons and glia cells and are mediators of cell migration. In brain tumors their expression is deregulated. Special attention is given to CXCL12/CXCR4 axis because initial reports showed that CXCL12 promotes migration of glioma cells *in vitro* and activation of MMPs (Sciumè et al., 2010).

2.6 Intracellular signal

Interaction of glioma cells with their microenvironment leads to intracellular signals that are very complex and very integrated (Figure 3). When glioma cells receive a pro-invasive signal through cell-surface growth factor receptor and cell-adhesion receptor, signaling molecules are activated to amplify and propagate the message. The signaling molecules are represented by cytoplasmic tyrosine kinases, adaptor molecules, and cytoskeletal proteins (Gladson et al., 2010).

Growth factor receptor and cell-adhesion receptor signaling can be co-ordinated to control cell proliferation, survival and migration. It has been shown that integrins regulate some receptor tyrosine kinases (RTK) such as EGFR. This cross-talk can occur in at least three mechanisms: RTK activation, propagation of ligand-mediated signaling and synergetic interaction to reach a final biological response (Cabodi et al., 2004).

Focal adhesion kinase (FAK) is a downstream effector of integrins and growth factor receptors. The phosphorylation of FAK leads to the activation of several signaling pathways through protein phosphorylation and protein-protein interaction. FAK has different domains which allow the integration of different signaling pathways. Phosphorylated FAK activates several pathways, including PI3K/Akt, MAPK and p130Cas/DOCK180/Rac. Overexpression of FAK is related with tumor progression (Schwock et al., 2010).

MAPK pathway – Activation of MAPK signaling pathway is triggered by growth factor receptor-bound-2 (Grb2)/son-of-sevenless (SOS) or FAK/Src complex. After RTK activation, autophosphorylation of the cytoplasmic domain of the receptor leads to recruitment of Grb2 and subsequently binding to the guanine exchange factor SOS. This complex interacts with small GTPase Ras and results in its activation. The next step is the sequential recruitment and activation of Raf, mitogen-activated protein kinase (MEK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK). ERK activates the expression of several transcriptional factors that control cell proliferation. Small GTPase Ras can also be activated by FAK/Src complex

when ECM components bind integrin. There is evidence that Src phosphorylates FAK, creating a binding site for the complex Grb2/SOS which leads to MAPK pathway activation (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Ramos, 2008; Huang et al., 2009).

Fig. 3. Intracellular signal downstream cell-surface growth factor receptor and cell-adhesion receptor activation.

PI3K/Akt pathway – Activated PI3K converts plasma membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) to phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃). PIP₃ leads to the activation of Akt that is involved in the regulation of several proteins related with cell survival. PI3K pathway is negatively regulated by phosphoinositide phosphatases such as PTEN. PTEN acts in the opposite way of PI3K converting PIP₃ to PIP₂. Loss of PTEN leads to an imbalance of PI3K/PTEN and results in increased activation of PIP₃ and Akt (Huang et al., 2009).

ERK and Akt signaling cascades are related with proliferation and survival, respectively. However, they are also involved in the invasion process because the activation of these pathways leads to activation of MMPs as MMP-2 and MMP-9 (Park et al., 2008; Drappatz et al., 2009).

RhoGTPase pathway – Members of the Rho family of small GTPases (Rho-GTPases) are important intracellular mediators that control directional cell migration. They can be activated by several pathways, including integrin and CD44 signaling pathways. It is known that Rho-GTPases are implicated with metastasis and tumor progression, what is not so surprising since RhoGTPases are downstream pathways that are deregulated in several tumors. There are also evidences that some GEFs are up-regulated in malignant brain tumors which increase activation of RhoGTPases as Rac1 and RhoA. Rac1 and RhoA have been related to glioma cell migration and invasion (Salhia et al., 2006).

2.7 Epithelial-mesenchymal transition

Migrating cells need to detach from the tumor mass to infiltrate neighboring tissue. For that reason, other important process in glioma migration is the epithelial-mesenchymal transition (EMT). It consists on biochemical changes in polarized epithelial cells which allow the cell to assume a mesenchymal cell phenotype. This phenotype is characterized by enhanced migratory capacity, invasiveness, elevated resistance to apoptosis, and increased expression of ECM components (Kalluri & Weiberg, 2009). EMT is very important during embryogenesis but it is also present in pathological conditions such as tumorigenesis, hypoxia, and inflammation (Nieto, 2011). It is widely known that this process plays an important role in glioma migration. However, the molecules involved are still not well established.

Cadherins have an important role in EMT. Classically, expression of E-cadherin is reduced while expression of N-cadherin and cadherin-11 are increased during EMT. Nevertheless, E-cadherin expression is very low in normal brain tissue and some glioma cell lines (Lewis-Tuffin et al., 2010; Utsuki et al., 2002). The role of cadherins in gliomas is still obscure. Differences in the role of cadherins can change depending on the glioma cell line. E-cadherin is found in SF767 cells and its expression is related to more invasive phenotype. However, just N-cadherin and cadherin-11 are found in U87 cell line. Ectopic expression of E-cadherin did not show any affect in migration in the U87 cell line (Lewis-Tuffin et al., 2010).

Probably, acquisition of mesenchymal phenotype involves an E-cadherin-independent pathway in glioma. One possible candidate is the transcription factor TWIST1. Mikheeva et al., 2010 showed that TWIST1 is responsible for changes in glioma cells that correlate with the phenotype associated with carcinoma EMT.

3. Treatments involving molecular targets related to cell invasion

There are several characteristics that must be considered when choosing a therapeutic target. First of all, the target must be overexpressed in tumor cells but not in normal cells. The target must be active and contribute to the malignant phenotype. It is very important that the therapeutic agent reaches easily its pharmacological target. Usually the first approach is against secreted molecules and cell surface receptors (Rich & Bigner, 2004).

3.1 Drugs in clinical trials

Recent advances in the understanding of glioma biology and signaling pathways have provided new tools to the development of molecularly targeted agents. There are a wide variety of targeted agents being studied in preclinical and clinical trials. However, the use of these agents alone has shown limited efficacy in almost all studies. That way combined inhibition of multiple targets are being studying, using molecules against targets from the same pathway or targets of parallel pathways. Although this strategy has a great potential, it should be considered the increase in the risk of toxic effects (Clarke et al., 2010).

3.1.1 Integrins inhibitors

Integrins are highly express in gliomas. There are monoclonal antibodies and peptide-based integrin inhibitors being investigated against various tumor types. However, only

cilengitide (EMD121974 - Merck KGaA, Darmstadt, Germany) is being studied in glioma. Cilengitide is a synthetic Arg-Gly-Asp (RGD) pentapeptide that recognizes RGD ligand-binding motifs on integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$, blocking ligand binding. RGD is an important motif that is present in some ECM components (Hynes, 2002). Relevant responses have been observed with cilengitide monotherapy in preclinical and clinical studies. Some combinatorial studies were carried out adding cilengitide to standard radiotherapy/TMZ in a randomized phase II trial. The results showed promising efficacy, especially in patients with MGMT promoter methylation. Phase III trial (CENTRIC) has started recruiting newly diagnosed patients with methylated promoter of MGMT to assess efficacy and safety of cilengitide in combination with standard treatment against standard treatment (Khasraw & Lassman, 2010; Onishi et al., 2010; Tabatabai et al., 2010).

3.1.2 Anti-tenascin-C

Tenascin-C is overexpressed in some patients with malignant gliomas and its presence seems to increase tumor cell invasion *in vitro* (Sarkar et al., 2006). Phase II studies using tenascin-specific antibody labeled with I^{131} (Neuradiab™) showed slight increase in survival time in patients with glioblastoma multiforme. Tenascin-specific antibody was administered directly into a surgically created resection cavity followed by standard treatment. Although some questions still remain, a Phase III trial of Neuradiab has started in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme (Akabani et al., 2005; Drappatz et al., 2009).

3.1.3 MMP inhibitors

Since the use of MMP inhibitors have shown decrease in glioma cell invasion *in vitro*, several clinical trials were performed. However, first and second generation of MMP inhibitors showed poor bioavailability and significant side effects. Marimastat is an orally drug that can reduce MMP levels in patients with glioma but several patients were removed from phase II trial because of intolerable side effects as joint pain (Newton, 2004; Nakada et al., 2007; Onishi et al., 2011). New MMP inhibitors are in development to improve selectivity and to diminish side effects. A new class of MMP inhibitors targets the MMP S_1' subsite pocket and does not interact with the zinc active site. The MMP S_1' pocket has loop residues called S_1' specificity loop that vary in size and sequence depending on the MMP. Because of that these inhibitors are more selective. However, there are no current clinical trials (Overall & Kleifeld, 2006; Devel et al., 2010).

3.1.4 Anti-EGF receptor

Tyrosine kinase inhibitors avoid phosphorylation and activation of downstream signaling. The most studied molecules are erlotinib and gefitinib. They are reversible small-molecules inhibitors for oral use. Several Phase II clinical trials showed that monotherapy using erlotinib and gefitinib did not bring any significant survival benefit when compared to control group in patients with glioblastoma multiforme. Patients that co-expressed EGFRvIII and PTEN were more responsive to erlotinib. However, this result was not reproducible in another study, showing the high complexity of individual tumors. Combination of tyrosine kinase inhibitors with standard therapy did not show also good results. Recent clinical trials are evaluating other EGFR inhibitors as irreversible EGFR inhibitors BIBW 2992 and PF-

00299804 and the humanized monoclonal antibody against EGFR, nimotuzumab (Nakada et al., 2007; Hatanpaa et al., 2010; Van Meir et al., 2010)

3.2 Potential molecules in study

3.2.1 Lithium

Studies *in vitro* using lithium potently blocked glioma cell migration. This molecule is known to activate β -catenin signaling. The treatment had little effect on cell viability and was associated with change in cell morphology with retraction of long extensions at the leading edge, suggesting an involvement of glycogen synthase kinase (GSK-3). The role of GSK-3 in cancer cell migration is not clear but it was observed an inverse correlation between GSK-3 expression and rate of glioma invasion (Barcellos-Hoff et al., 2009).

3.2.2 Emodin

Emodin is one of the active components of the *Rheum palmatum* L. and is a protein tyrosine kinase inhibitor. It has several biological activities including antiviral, antimicrobial, immunosuppressive, and anticancer effects. Studies *in vitro* and *in vivo* showed that emodin decreased MMP-2 and MMP-9 expression by blocking FAK and Akt activation. It also suppressed HA-stimulated AP1 and NF κ B promoter activities (Park et al., 2008).

3.2.3 RECK

RECK (Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs) is a membrane-anchored glycoprotein. RECK can be found in various normal human tissues but its expression is low or undetectable in many tumors, including gliomas. RECK was first described as a tumor and metastasis suppressor gene, inhibiting at least three different metalloproteinases; MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP. Re-expression of RECK in some tumor cell lines leads to a strong inhibition of tumor invasion, metastasis and angiogenesis (Takahashi et al., 1998; Oh et al., 2001; Noda et al., 2003; Meng et al., 2008). Corrêa et al. (2006) showed correlation between expression of RECK and invasive potential *in vitro*. The less invasive glioma cell line had higher RECK expression when compared to the more invasive glioma cell line.

In 2010, Corrêa et al. showed that overexpression of RECK in a glioma cell line (T98G) compromises glioma cell ability to migrate and invade *in vitro*. Results demonstrated that overexpression of RECK did not alter MMP activity but was responsible for cytoskeleton rearrangement, causing changes in cell motility. It is unknown how RECK leads to changes in cell motility but the elucidation of this mechanism could bring new potential targets to inhibit cell migration.

3.3 Issues in preclinical and clinical studies

In vitro experimental system and animal models are very important to study the biology of glioma invasion and to test anti-invasive therapy. They need to be accurate, representative and valid. Monolayer cultures of permanent glioma cell lines are widely used in experimental systems. However, these cell lines suffer biological changes during cell culture

and the lack of ECM-cell interaction causes changes in some gene expression, as shown by several studies (Nelson & Bissel, 2006). There are some 3D models available as spheroids but they also have some limitations because of the high complexity of tumors.

Brain tumor animal models are used to study new therapies. These models have to be accurate and reproducible to provide trustful results avoiding the exposure of patients to non-efficacious or unsafe drugs. Tumor xenografts models and transgenic models are two widely used animal models. These models have some advantages over *in vitro* models but they also have some limitations. For instance, xenografts models represent phenotypic diversity but they lack tumor environment interactions and do not reproduce invasive growth patterns. Transgenic models in the other way are good models for studying the impact of cell invasion, vascular limitations to drug delivery and interaction with the surrounding tissue. However, they do not reproduce tumor heterogeneity and genomic instability. For that reason, some drugs that have shown great anti-tumor activity fail in clinical trials (Rich & Bigner, 2004; King et al., 2005).

When studying a new drug, some parameters need to be evaluated: evaluation of dosing sequences, markers of therapeutic efficacy and intra-cerebral delivery. In clinical neuro-oncology trials there are some difficulties to measure efficacy and to obtain tumor tissue for sampling. Clinical efficacy should be based on overall survival. However, survival is not a good endpoint due to the variability of treatments that patients were submitted before and after trials. Biomarker measurement is essential to targeted therapy trials but lack of tissue sampling after experimental drug treatment is a problem (Rich & Bigner, 2004).

Chapter summary

- Failure in malignant glioma treatment is due multiple causes as local invasive nature of glioma cells, resistance to radiotherapy and chemotherapy; and presence of the blood brain barrier.
- Invasion is a major clinical problem. This process is highly complex, involving multiple pathways and relaying on a network of paracrine interactions. Contact between cells and the extracellular matrix is dynamic since it can change as cancer cells disseminate and reciprocally lead to activation of important signals for cytoskeleton rearrangement and matrix proteolyses.
- Treatment combining multiple drugs is the key to contain glioma progression, targeting not solely cancer cells but also the microenvironment. However, the discovery for new drugs is still a long process and improvement in models for preclinical tests is required.

4. Conclusion

Targeted therapy against invasion-related molecules is a promising alternative for treating malignant gliomas. Although tumor cells are widely disseminated when the patient is diagnosed, anti-invasive therapies for malignant gliomas have as its main goal to contain

the disease and increase the efficacy of local treatments. Migration signaling shares common pathways with proliferation and apoptosis. That way, the use of combining therapy could increase the efficiency of conventional cytotoxic treatments, improving cell death. Advances in the understanding of tumor invasion have improved the development of new therapies. However, not all questions have been answered and some challenges still remain.

5. Acknowledgment

The authors are thankful to FAPESP (Raquel Brandão Haga's Fellowship Contract Grant No.: 09/12135-2), CNPq, PRPG-USP and CAPES. We are especially grateful to Dr Mari Cleide Sogayar (Chemistry Institute, University of São Paulo) and previous members of the laboratory of Clinical Cytopathology from School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Dr Tatiana C.S. Corrêa and Renato R. Massaro for all contribution in RECK studies in glioma model.

6. References

- Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox A.K. & Bigner, D.D. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Vol. 18, No. 8, pp. 1061-1083.
- Akabani, G., Reardon, D.A., Coleman, E., Wong, T.Z., Metzler, S.D., Bowsher, J.E., Barboriak, D.P., Provenzale, J.M., Greer K.L., DeLong, D., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Zhao, X-G., Pegram, C.N., McLendon, R.E., Bigner, D.D. & Zalutsky, M.R. (2005). Dosimetry and Radiographic Analysis of ¹³¹I-Labeled Anti-Tenascin 81C6 Murine Monoclonal Antibody in Newly Diagnosed Patients with Malignant Gliomas: A Phase II Study. *The Journal of Nuclear Medicine*, Vol. 46, No. 6, pp. 1042-1051.
- Argyriou, A.A., Antonacopoulou, A., Iconomou, G. & Kalofonos, H.P. (2009). Treatment options for malignant gliomas, emphasizing towards new molecularly targeted therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 69, pp. 199-210.
- Bao, S., Qiulian, W., MacLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. & Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, Vol. 444, pp. 756-760.
- Barcellos-Hoff, M.H., Newcomb, E.W., Zagzag, D. & Narayana, A. (2009). Therapeutic Targets in Malignant Glioblastoma Microenvironment. *Seminars in Radiation Oncology*, Vol. 19, pp. 163-170.
- Bellail, A.C., Hunter, S.B., Brat, D.J., Tan, C., Van Meir, E.G. (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 36, pp.1046-1069.
- Berens, M.E. & Giese, A. (1999). "...those left behind." Biology and Oncology of Invasive Glioma Cells. *Neoplasia*, Vol. 1, No. 3, pp. 208-219.
- Berrier, A.L. & Yamada, K.M. (2007). Cell-Matrix Adhesion. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 213, pp.565-573.
- Bourguignon, L.Y.W. (2008). Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*, Vol. 18, No. 4, pp. 251-259.

- Brakebusch, C. & Fässler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO Journal*, Vol. 22, No. 10, pp.2324-2333.
- Cabodi, S., Moro, L., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Di Stefano, P., Turco, E. Tarone, G. & Defilippi, P. (2004). Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 32, Part 3, pp. 438-442.
- Central Brain Tumor Registry of the United States (2010). CBTRUS 2010 Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States. Central Brain Tumor Registry of the United States, 2004-2006. <http://www.cbtrus.org/2010-NPCR-SEER/CBTRUS-WEBREPORT-Final-3-2-10.pdf> (accessed January 27, 2011).
- Chandrasekar, N., Mohanam, S., Gujrati, M., Oliveiro, W.C., Dinh, D.H. & Rao, J.S. (2003). Downregulation of uPA inhibits migration and PI3K/Akt signaling in glioblastoma cells. *Oncogene*, Vol. 22, pp. 392-400.
- Claes, A., Idema, A.J. & Wesseling, P. (2007). Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathologica*, Vol. 114, pp. 443-458.
- Clarke, J., Butowski, N. & Chang, S. (2010). Recent Advances in Therapy for Glioblastoma. *Archives of Neurology*, Vol. 63, No. 3, pp. 279-283.
- Corrêa, T.C.S., Brohem, C.A., Winnischofer, S.M.B., Da Silva Cardeal, L.B., Sasahara, R.M., Taboga, S.R., Sogayar, M.C., Maria-Engler, S.S. (2006). Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 99, p.156-167.
- Corrêa, T.C.S., Massaro, R.R., Brohem, C.A., Taboga, S.R., Lamers, M.L., dos Santos, M.F., Maria-Engler, S.S. (2010). RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 110, p. 52-61.
- D'abaco, G.M. & Kaye, A.H. (2007). Integrins: Molecular determinants of glioma invasion. *Journal of Clinical Neuroscience*, Vol.14, p.1041-1048.
- Demuth, T & Berens, M.E. (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 70, pp. 217-228.
- Devel, L., Czarny, B., Beau, F., Georgiadis, D., Stura, E. & Dive, V. (2010). Third generation of matrix metalloprotease inhibitors: Gain in selectivity by targeting the depth of the S₁' cavity. *Biochimie*, Vol. 92, pp. 1501-1508.
- Drappatz, J., Norden, A.D. & Wen, P.Y. (2009). Therapeutic strategies for inhibiting invasion in glioblastoma. *Expert Review of Neurotherapeutics*, Vol. 9, No. 4, pp. 519-534.
- Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E. (1999). Integrin Signaling. *Science*, Vol. 285, pp. 1028-1032.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E. & Westphal, M. (2003). Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 21, pp. 1624-1636.
- Gladson, C.L. (1999). The Extracellular Matrix of Gliomas: Modulation of Cell Function. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Vol.58, pp. 1029-1040.
- Gladson, C.L., Prayson, R.A. & Liu, W.M. (2010). The Pathobiology of Glioma Tumors. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Vol. 5, pp. 33-50.
- Goldbrunner, R.H, Bernstein, J.J. & Tonn, J-C. (1998). ECM-Mediated Glioma Cell Invasion. *Microscopy Research and Technique*, Vol. 43, pp. 250-257.
- Goldbrunner, R.H., Bernstein, J.J. & Tonn, J.-C. (1999). Cell-Extracellular Matrix Interaction in Glioma Invasion. *Acta Neurochirurgica (Wien)*, Vol. 141, pp. 295-305.

- Hatanpaa, K.J., Burma, S., Zhao, D. & Habib, A.A. (2010). Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. *Neoplasia*, Vol. 12, pp. 675-684.
- Hoelzinger, D.B., Demuth, T. & Berens, M.E. (2007). Autocrine Factors That Sustain Glioma Invasion and Paracrine Biology in the Brain Microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 99, pp. 1583-1593.
- Huang, P.H., Xu, A.M. & White, F.M. (2009). Oncogenic EGFR Signaling Networks in Glioma. *Science Signaling*, Vol. 2, No. 87, pp. 1-13.
- Huang, Z., Cheng, L., Guryanova, O.A., Wu, Q. & Bao, S. (2010). Cancer stem cells in glioblastoma – molecular signalling and therapeutic targeting. *Protein & Cell*, Vol. 1, No. 7, pp.638-655.
- Huse, J.T. & Holland, E.C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 10, pp. 319-331.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Birectional Allosteric Signaling Machines. *Cell*, Vol. 110, pp. 673-687.
- Iden, S. & Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 9, pp. 846-859.
- Jones, T.S. & Holland, E.C. (2010). Molecular Pathogenesis of Malignant Glial Tumors. *Toxicology Pathology*, Vol. 000, No. 00, pp. 1-9.
- Kalluri, R. & Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 119, No. 6, pp. 1420-1428.
- Khasraw, M. & Lassman, A.B. (2010). Advances in the Treatment of Malignant Gliomas. *Current Oncology Reports*, Vol. 12, pp. 26-33.
- Kim, M-S., Park, M-J., Moon, E-J., Kim, S-J., Lee, C-H., Yoo, H., Shin, S-H., Song, E-S. & Lee, S-H. (2005). Hyaluronic Acid Induces Osteopontin via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway to Enhance the Motility of Human Glioma Cells. *Cancer Research*, Vol. 65, pp.686-691.
- King, G.D., Curtin, J.F., Candolfi, M., Kroeger, K., Lowenstein, P.R. & Castro, M.G. (2005). Gene therapy and targeted toxins for glioma. *Current Gene Therapy*, Vol. 5, No. 6, pp. 535-557.
- Lage, H. (2008). An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 65, pp. 3145-3167.
- Lamszus, K. & Günther, H.S. (2010). Glioma stem cells as a target for treatment. *Targeted Oncology*, Vol. 5, pp. 211-215.
- Lewis-Tuffin, L.J., Rodriguez, F., Giannini, C., Scheithauer, B., Necela, B.M., Sarkaria, J.N. & Anastasiadis, P.Z. Misregulated E-Cadherin Expression Associated with and Aggressive Brain Tumor Phenotype. *PLoS ONE*, Vol. 5, No. 10, e13665. doi:10.1371/journal.pone.0013665.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L. & Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma. In: *Molecular Cancer*, 25.02.2011, Available from <http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/67>
- Louis, D.N. (2006). Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Vol. 1, pp. 97-117.

- Lu, C. & Shervington, A. (2008). Chemoresistance in gliomas. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 312, pp. 71-80.
- Meng, N., Li, Y., Zhang, H. & Sun, X-F. (2008). RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. *Histology and Histopathology*, Vol. 23, p.1003-1010.
- Mikheeva, S.A., Mikheev, A.M., Petit, A., Beyer, R., Oxford, R.G., Khorasani, L., Maxwell, J-P., Glackin, C.A., Wakimoto, H., Gonzles-Herrero, I., Snchez-Garca, I., Silber, J.R., Homer, P.J. & Rostomily, R.C. (2010). TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. In: *Molecular Cancer*. Available from <http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/194>
- Minniti, G., Muni, R., Lanzetta, G., Marchetti, P. & Maurizi Enrici, R. (2009). Chemotherapy for Glioblastoma: Current Treatment and Future Perspectives for Cytotoxic and Targeted Agents. *Anticancer Research*, Vol. 29, pp. 5171-5184.
- Murai, T., Miyazaki, Y., Nishinakamura, H., Sugahara, K.N., Miyauchi, T., Sako, Y., Yanagida, T. & Miyasaka, M. (2004). Engagement of CD44 Promotes Rac Activation and CD44 Cleavage during Tumor Cell Migration. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 6, pp. 4541-4550.
- Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N.L., Hoelzinger, D.B. & Berens, M.E. (2007). Molecular targets of glioma invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 64, pp. 458-478.
- Newton, H.B. (2004). Molecular neuro-oncology and the development of targeted therapeutic strategies for brain tumors - Part 3: brain tumor invasiveness. *Expert Review of Anticancer Therapy*, Vol. 4, No. 5, pp. 803-821.
- Nieto, M.A. (2011). The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 27, pp. 16.1-16.30.
- Noda, M., Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Kitayama, H. & Takahashi, C. (2003). RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer and Metastasis Reviews*, Vol. 22, p.167-175.
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y, Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C. & Noda, M. (2001). The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. *Cell*, Vol. 107, p. 789-800.
- Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K. & Date, I. (2011). Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathology*, Vol. 28, No., 1, pp. 13-24.
- Overall, C.M. & Kleifeld, O. (2006). Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, Vol. 94, pp. 941-946.
- Park, J.B., Kwak, H-J. & Lee, S-H. (2008). Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adhesion & Migration*, Vol. 2, No. 3, pp. 202-207.
- Paulus, W. & Tonn, J.C. (1994). Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. *Journal of Neurosurgery*, Vol. 80, p.515-519.
- Ramos, J.W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 40, pp. 2707-2719.
- Rich, J.N. & Bigner, D.D. (2004). Development of Novel Targeted Therapies in the Treatment of Malignant Glioma. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 3, pp. 430-446.

- Salhia, B., Tran, N.L., Symons, M., Winkles, J.A., Rutka, J.T. & Berens, M.E. (2006). Molecular pathways triggering glioma cell invasion. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, Vol. 6, No. 4., pp. 613-626.
- Sarkar, S., Nuttall, R.K., Liu, S., Edwards, D.R. & Young, V.W. (2006). Tenascin-C Stimulates Glioma Cell Invasion through Matrix Metalloproteinase-12. *Cancer Research*, Vol. 66, pp. 11771-11780.
- Sciumè, G., Santoni, A. & Bernardini, G. (2010). Chemokines and glioma: Invasion and more. *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 224, pp. 8-12.
- Schoenwaelder, S.M. & Burridge, K. (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 11, p.274-286.
- Schwock, J., Dhani, N. & Hedley, D.W. (2010). Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Vol. 14, No. 1, pp. 77-94.
- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 5, pp. 219-234.
- Tabatabai, G., Weller, M., Nabors, B., Picard, M., Reardon, D., Mikkelsen, T. Ruegg, C. & Stupp, R. (2010). Targeting integrins in malignant glioma. *Targeted Oncology*, Vol. 5, pp. 175-181.
- Takahashi, C., Sheng, Z., Horan, T.P., Kitayama, H., Maki, M., Hitomi, K., Kitaura, Y., Takai, S., Sasahara, R.M., Horimoto, A., Ikawa, Y., Ratzkin, B.J., Arakawa, T. & Noda, M. (1998). Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, Vol. 95, No. 22, p. 13221-13226.
- Teodorczyk, M. & Martin-Villalba, A. (2010). Sensing Invasion: Cell Surface Receptors Driving Spreading of Glioblastoma. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 222, pp. 1-10.
- Tysnes, B.B. & Mahesparan, R. (2001). Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 53, pp. 129-147.
- Utsuki, S., Sato, Y., Oka, H., Tsuchiya, B., Suzuki, S. & Fujii, K. (2002). Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 57, pp. 187-192.
- Van Meir, E.G., Hadjipanavis, C.G., Norden, A.D., Shu, H-K., Wen, P.Y. & Olson, J.J. (2010). Exciting New Advances in Neuro-Oncology – The Avenue to Cure for Malignant Glioma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 60, pp. 166-193.
- Viapiano, M.S., Hockfield, S. & Matthews, R.T. (2008). BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 88, pp. 261-272.
- Wehrle-Haller, B. & Imhof, B.A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 35, pp. 39-50.
- Wen, P.Y. & Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 359, pp. 492-507.

ANEXO II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0542010/FCF

São Paulo, 17 de setembro de 2010

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Inibição da migração e invasão mediado pelo gene RECK em modelo de glioma humano: um estudo de mecanismos".

Em anexo envio cópia do CQB da Unidade para necessário quando da solicitação de recursos junto a agências de fomento.

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

Prof.Dr. MÁRIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **SILVYA STUCHI MARIA ENGLER**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 70 /2003

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 2º, inciso XIII, do Decreto nº 1.752, de 20 de dezembro de 1995, torna público que na 73ª Reunião Ordinária, ocorrida em 11 de Dezembro de 2003, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico prévio conclusivo para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.003570/98-08.

Requerente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP.

CNPJ: 63.025.530/0015-00.

Endereço: Av. Prof. Linu Prestes, 580, Bloco 13A, Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", CEP: 05508-900, São Paulo - SP; Telefone: (11) 818-3678; Fax: (11) 211-8986.

Assunto: Solicitação de Extensão de Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB 90/98) para pesquisa em regime de contenção com organismo geneticamente modificado.

Extrato Prévio: nº 63/03 - Publicado no D.O.U nº 204, de 21/10/03 - Seção 03 - Página 3

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico Conclusivo para extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança, conclui pelo DEFERIMENTO, ficando incluído no CQB nº 90/98 as instalações do Laboratório de Pesquisa de Patologia e Citologia para as atividades de pesquisa de regime em contenção (Nível de Biossegurança NB-1) e ensino. No âmbito das competências do art. 1º-D da Lei 8974/95, a Comissão concluiu que o pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A íntegra deste Parecer Técnico Prévio Conclusivo da CTNBio consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares, solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas por escrito à Secretaria executiva da CTNBio - SPO Área 5 Quadra 3 - Bloco B - Térreo - Sala 8 - CEP: 70610-200 - Brasília - DF. Telefone: (61) 411 - 5516; Fax: (61) 411 - 5196.

JORGE ALMEIDA GUIMARÃES