Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Ação do gene supressor de tumor e de metástase *RECK* no processo de invasão tumoral: modelo de interação célula-matriz extracelular em gliomas humanos

Tatiana Caroline Silveira Corrêa

Dissertação para obtenção do grau de Mestrado

Orientadora: Professora Dr^a. Silvyia Stuchi Maria-Engler

São Paulo

Agosto de 2005

Ao Eduardo e à Luísa, meus amores.

Agradecimentos

Acho difícil conseguir agradecer suficientemente todo apoio que me foi concedido neste período... mas vou tentar! Quero agradecer a cada um em especial por ter feito parte, de qualquer maneira que seja, da elaboração desta dissertação.

À Silvy, minha orientadora, em todos os sentidos desta palavra! Obrigada pelos sábios conselhos e por ter me ensinado pacientemente que todo trabalho, por maior que possa parecer, é composto por pequenas partes. À minha amiga Silvy, por ter acreditado na minha capacidade de realizar este trabalho antes mesmo que eu o fizesse. Ao Cláudio e ao Carlinhos por dividir a Silvy comigo e com todo pessoal que ela orienta; e também pelos momentos de lazer que passamos juntos ao longo deste período.

À professora Ana Campa, por ter sido responsável oficialmente por mim no início da pós-graduação na FCF-USP. A todos os funcionários da FCF-USP, que fazendo seu trabalho possibilitaram que o meu trabalho pudesse ser realizado.

À professora Mari Sogayar, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório, onde pude crescer cientificamente, facilitando assim a realização do meu projeto. Também é claro, pela colaboração durante o mestrado, fundamental para viabilização de muitos ensaios aqui descritos. À toda equipe técnica do laboratório da Professora Mari: Zizi, Débora, Sandra e Ricardo pelo excelente suporte nos experimentos que realizei no IQ-USP. A todos os alunos da professora Mari pelas conversas e todo tipo de ajuda que me foi dispensada. Em especial aos meus amigos Christian, Sheila, Marina, Ana Paula e Marcos, que além de me apoiar na parte científica são pessoas de excelente convívio.

Ao professor Hamza Fahmi Ali El-Dorry, por ter me proporcionado uma excelente iniciação científica, quando eu não sabia nem o que era um termociclador... Também por ler projetos, dar conselhos e oferecer seu laboratório para o que fosse preciso no desenvolvimento do mestrado. A todo mundo do seu laboratório por serem meus amigos e por estarem sempre

disponíveis nos momentos de qualquer necessidade: Ari, Augusto, Felipe, Erik, Wilton, Inês, César e ao Eric, que muito me ensinou na iniciação científica.

À Luísa e ao Eduardo que me deram o que há de mais precioso nesta vida (do meu ponto de vista) e que não se pode comprar: tempo. Além disso, pelo carinho, pelo incentivo, pela compreensão nas horas difíceis e, especialmente ao Edu pelo apoio financeiro durante o período de bolsa...

Aos meus pais, Alexi e Almiro, que me proporcionaram muito bons estudos fundamentais, o que tornou possível e mais fácil a execução deste projeto.

Aos pais do Eduardo, Paulo e Alice, e à minha mãe, que por tantas vezes cuidaram da minha filha tão bem quanto eu cuidaria, para que eu pudesse trabalhar até mais tarde ou nos finais de semana, quando não havia escola. Também por comemorarem comigo cada pequena vitória deste percurso.

Às queridas amigas Zilda, Zizi e Marluce por tornarem os almoços no bandeirão momentos de muita alegria. Pela amizade, carinho e por todo o tipo de ajuda que nunca se negaram a me prestar. À Marluce por, além disso, ser minha colega em cursos nem sempre tão fáceis, mas muito importantes para nossa formação.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia, que me recebeu tão bem no ingresso do curso e por terem se revelado colegas tão prestativos e compreensivos sempre. Aos meus amigos de laboratório: Laura, que começou junto comigo, sendo muito companheira na fase mais difícil do nosso trabalho; Carlinha, por ser tão responsável e tão competente, mesmo sendo tão novinha! Ao Renato, meu primeiro aluno de iniciação pela ajuda e pela convivência; e aos demais que estão se juntando ao nosso grupo: Carla Fernandes, Janaína, Daniela e Kaio.

Ao professor Sebastião Roberto Taboga por ser nosso colaborador e por ter me recebido em seu laboratório de Microanálises no IBILCE-UNESP, onde pude aprender muito sobre microscopia. Ao Luiz, técnico do laboratório de Microanálises, por ter me ensinado várias técnicas de corte e coloração dos materiais.

Aos meus professores dos cursos de pós-graduação por contribuir para meu aprendizado ministrando bons cursos.

A meu pai, Almiro, e à Lenita Rímoli Esteves, pela ajuda com revisões do inglês.

À minha toda família, pelo apoio e pelo carinho que sempre tiveram por mim. Em especial à minha irmã, Glenda, sempre a pessoa mais presente em todos os momentos da minha vida! A todos os meus amigos, mesmo distantes do trabalho, que tornam tudo mais fácil, só por serem meus amigos: Fabrizia, Simone, Ricardo, Helga, Maurício (Guarabira), Nathalie e Patrick.

Ao CNPq, FAPESP e PRP-USP, por ter dado suporte financeiro a este projeto.

Índice geral

	Página
1. Introdução.....	01
1.1 Câncer.....	01
1.2 Os tumores da glia.....	02
1.3 Interações célula-matriz extracelular.....	03
1.4 As metaloproteases da MEC.....	06
1.5 O gene supressor de tumor <i>RECK</i>	09
2. Objetivo geral.....	15
3. Objetivos específicos.....	15
3.1 Obtenção de gel de colágeno tipo 1 hidratado.....	15
3.2 Avaliação da influência do substrato no crescimento das linhagens A172 e T98G.....	16
3.3 Avaliação do caráter invasivo das linhagens A172 e T98G nos diferentes substratos.....	16
3.4 Avaliação da expressão do gene <i>RECK</i>	16
3.5 Avaliação da atividade de MMPs.....	16
4. Material e métodos.....	17
4.1 Preparo de substratos de matriz extracelular.....	17
4.2 Cultivo celular.....	18
4.3 Curvas de crescimento.....	19
4.4 Cortes histológicos e microscopia eletrônica.....	19
4.5 Northern blot e PCR em tempo real.....	20
4.5.1 Preparação de RNA total.....	20
4.5.2 Preparação dos cDNAs para PCR em tempo real..	21
4.5.3 Reação de PCR em tempo real.....	22
4.6 Zimografia.....	23
5. Resultados obtidos.....	24
5.1 Curvas de crescimento.....	24
5.2 Cortes histológicos e microscopia eletrônica.....	27
5.3 Northern blot e PCR em tempo real.....	32
5.4 Zimografia.....	39
6. Discussão.....	44
7. Conclusões.....	52
8. Referências Bibliográficas.....	53

Índice de Tabelas e Figuras

	Página
Tabela 1: Estimativas de incidência e mortalidade para gliomas no Brasil, na América Latina e no mundo, segundo IARC – International Agency for Research on Câncer – USA.	02
Tabela 2: Seqüências dos “primers” utilizados nas reações de PCR em tempo real.	22
Tabela 3: Tempos de dobramento das linhagens A172 e T98G para os três substratos estudados.	24
Figura 1: Mecanismos de ação de RECK na regulação das MMPs 2 e 9.	12
Figura 2: Curvas de crescimento das linhagens A172 e T98G para os diferentes substratos.	25
Figura 3: Aspectos morfológicos das células A172 e T98G na presença de plástico, colágeno e Matrigel.	26
Figura 4: Cortes semi-finos das células A172 após 7 dias de cultivo em colágeno.	29
Figura 5: Cortes semi-finos das células T98G após 7 dias de cultivo em colágeno, mostrando invasão do substrato.	29
Figura 6: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da célula A172 cultivada em colágeno.	30
Figura 7: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da célula T98G cultivada em colágeno.	31
Figura 8: Gel de agarose dos RNAs extraídos das linhagens A172 e T98G para transcrição reversa.	32
Figura 9: Perfis da expressão do gene RECK em relação aos controles internos GAPDH e Tubulina.	36
Figura 10: Perfis das expressões dos genes MMP-2, MMP-9, MT1-MMP e TIMP-2 em relação ao controle interno Tubulina.	37

Figura 11: Ensaio de Northern blot para o gene RECK.	38
Figura 12: Gel de zimografia com atividades das MMPs 2 e 9, para as linhagens A172 e T98G cultivadas nos diferentes substratos.	39
Figura 13: Análise das atividades das MMPs 2 e 9 comparando as linhagens A172 e T98G em cada substrato testado.	41
Figura 14: Análise das atividades das MMPs 2 e 9 comparando os diferentes substratos para a linhagem A172.	42
Figura 15: Análise das atividades das MMPs 2 e 9 comparando os diferentes substratos para a linhagem T98G.	43
Figura 16: Géis de zimografia com os inibidores de MMPs EDTA e Ilomastat.	44

Resumo

A invasão de células tumorais para o tecido cerebral sadio é a marca patológica dos gliomas e contribui para o fracasso das modalidades terapêuticas atuais (cirurgia, radioterapia e quimioterapia). As células da glia transformadas apresentam os padrões clássicos do processo invasivo, incluindo adesão celular aos componentes da matriz extracelular (MEC), locomoção celular e a capacidade de remodelar o espaço extracelular.

As metaloproteases de matriz (MMPs) são essenciais para o remodelamento adequado da MEC e para a invasão. O proteína supressora de tumor e metástase RECK regula pelo menos três diferentes membros da família das MMPs, especificamente: MMP-2, MMP-9 e MMP-14. Com o propósito de mimetizar o processo invasivo *in vivo*, as linhagens celulares de glioma humano A172 e T98G, respectivamente não invasiva e invasiva, foram plaqueadas em plástico (controle), colágeno tipo 1 ou Matrigel – membrana basal reconstituída, e incubadas por 3 e 7 dias, para estabelecer o processo invasivo.

Nossos resultados mostram uma diminuição das taxas de proliferação e alterações morfológicas quando estas células foram cultivadas na presença de colágeno ou Matrigel. Microscopia eletrônica de transmissão das células T98G, cultivadas por 7 dias em colágeno, evidenciam invaginações de membrana similares ao que foi recentemente descrito como podossomos. Este novo tipo de estrutura é encontrado tipicamente em células que precisam cruzar barreiras teciduais, já que são sítios de degradação da MEC. A presença destas estruturas reforça o caráter invasivo da linhagem T98G. Ensaios de PCR em tempo real revelaram maior expressão de mRNA de *RECK* nas células A172, quando comparadas às células T98G, nas três condições de cultivo. Interessantemente as células A172 apresentaram maior expressão de *RECK* no colágeno tipo 1, enquanto a T98G demonstra uma tendência de aumento na expressão de *RECK* para colágeno tipo 1 e Matrigel. As MMPs são mais expressas e possuem maior atividade nas células T98G, e também são induzidas pelo substrato de colágeno.

Estes resultados sugerem: 1) a expressão de *RECK* é diminuída pelo caráter invasivo apresentado por T98G, 2) o uso de substratos de MEC, como

colágeno tipo 1 (A172 e T98G) e Matrigel (T98G), permite modular a expressão de *RECK* nestas linhagens de glioma. Como foi estabelecida uma correlação positiva entre a expressão de RECK e a taxa de sobrevida de pacientes para vários tipos tumorais, nossos resultados podem contribuir para o esclarecimento dos complexos mecanismos do processo invasivo no modelo de gliomas.

Abstract

The invasion of neoplastic cells into healthy brain tissue is a pathologic hallmark of gliomas and contributes to the failure of current therapeutic modalities (surgery, radiation and chemotherapy). Transformed glial cells display the common attributes of the invasion process, including cell adhesion to extracellular matrix (ECM) components, cell locomotion, and the ability to remodel the extracellular space.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are essential for proper ECM remodeling and invasion. The tumor and metastasis suppressor RECK protein regulates at least three members of the matrix metalloproteinase (MMPs) family, namely: MMP-2, MMP-9 and MMP-14. In order to mimic the *in vivo* invasion process, A172 and T98G, respectively, non-invasive and invasive human glioma cell lines were plated onto either plastic (control), or collagen type I gel or Matrigel™-basement membrane reconstituted, and incubated for 3 and 7 days, to establish the invasion process.

Our results indicate decreased growth rates and morphological alterations regarding the invasive phenotype when these cell lines are cultured onto collagen gel and Matrigel™. Electronic transmission microscopy of T98G cells, cultured for 7 days onto collagen, pointed out membrane invaginations that are similar to what was recently described as podosomes. These new structures are typically found in cells that have to cross tissue boundaries, since they are sites of ECM degradation. The presence of these structures reinforces the invasive behavior of T98G cell line. Real time PCR assays revealed higher RECK mRNA expression in A172 cells, when compared to T98G cells in all three different substrate conditions. Interestingly, A172 cells displayed the upregulation of RECK expression in collagen gel, while in T98G high RECK expression was observed both in collagen and in Matrigel™. MMPs appear more expressed and more active for T98G cells, and are also upregulated by collagen.

These results suggest that: 1) RECK expression is downregulated in the invasion process displayed by T98G cells, 2) coating of the substrate with ECM elements, such as collagen in the case of A172, and Matrigel™ and Collagen for T98G cells, can modulate RECK expression in glioma cell lines. Since positive correlation between RECK expression and survival of patients has been noted in several types of tumors, our preliminary results can contribute to elucidate the complex mechanisms of the glioma invasiveness process.

Índice de abreviaturas utilizadas neste trabalho

ATCC- American tissue and cell collection

bFGF- fator de crescimento básico de fibroblastos

C- colágeno tipo 1

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

EGF- fator de crescimento epidérmico

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GBM- glioblastoma multiforme

GPI – glicosil fosfatidil inositol

HE- hematoxilina-eosina

IL-6- interleucina 6

INCA- Instituto Nacional de Câncer

kDa- kilodaltons

M- matrigel

MEC- matriz extracelular

MLH-1- mutL homolog 1

MMPs- metaloproteases de matriz

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

MT1-MMP- metaloprotease 1 do tipo de membrana

NOTCH-1- Notch homolog 1, associado a translocação

OSCC- carcinoma escamoso de cavidade oral

P- plástico

PCR- reação da polimerase em cadeia

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

RNAi – RNA de interferência

SF-HGF- fator de crescimento hepático

SNC- sistema nervoso central

TGF- β - fator de crescimento transformante β

TIMP- inibidores teciduais de metaloproteases

uPA- plasminogênio tipo uroquinase

VEGF- fator de crescimento endotelial de vasos

1. Introdução

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um amplo conjunto de doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células transformadas, que podem invadir virtualmente todos os tecidos e órgãos através das metástases, prejudicando suas funções básicas. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células de onde se originam, à velocidade de crescimento da massa tumoral, à capacidade de invasão e ao tipo de mutação que deu origem à transformação.

Atualmente, a incidência de câncer é tão elevada, que se torna redundante qualquer demonstração da extrema importância de se conhecer melhor os mecanismos utilizados pelas células transformadas, a fim de se poder combater eficientemente este mal que cada vez mais aflige pessoas por todo o planeta.

A estimativa para o ano de 2005 do National Câncer Institute – USA, é de mais de 1.300.000 novos casos de câncer nos Estados Unidos, com previsão de quase 600.000 óbitos. Dados do INCA estimam que neste ano surjam cerca de 500.000 novos casos no Brasil.

Dentre os tumores de diversas origens, os tumores de cérebro e do Sistema Nervoso Central (SNC) chamam a atenção por apresentar um dos piores prognósticos. Apesar de estes tumores contribuírem para morte de apenas 2% dos pacientes com câncer, a sobrevida média é de 15 meses (Osborne *et al*, 2001; Demuth & Berens, 2004). A estimativa do National Câncer Institute – USA para este ano é de que sejam diagnosticados 18.500 novos casos nos EUA, sendo que quase 13.000 pacientes irão a óbito. Em outras palavras, ou melhor, em outros números, cerca de 70% destes pacientes irão a óbito.

O panorama no Brasil é igualmente assustador; a tabela 1 deixa clara a magnitude do problema.

Área	Incidência		Mortalidade	
	♂	♀	♂	♀
Mundo	3,6	2,5	2,6	1,9
América do Sul	4,8	3,7	3,6	2,8
Brasil	6,0	4,6	4,5	3,5

Tabela 1: Estimativas de incidência e mortalidade causadas por gliomas para o ano de 2000, geradas pelo software GLOBOCAN 2000, publicado pela IARC- International Agency for Research on Câncer - EUA. Números para cada 10.000 pessoas.

1.2 Os tumores da glia

O tecido cerebral é composto por dois tipos principais de células: os neurônios e a neuróglia (glia). A glia é formada por quatro tipos de células que são os astrócitos, oligodendrócitos, endotélio e microglia.

Os tumores da glia, genericamente conhecidos como gliomas, são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (Akbasak & Sunar-Akbasak, 1992; JAMA, 2005). Os gliomas são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em astrocitomas, oligodendromas e oligoastrocitomas. Eles são graduados em escala de I a IV de acordo com o grau de malignidade. Dentre os gliomas, os tumores mais frequentes são os astrocitomas que se classificam em: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (Maher *et al*, 2001). Este progresso histológico, começando no menor grau em direção aos tumores de maior grau constitui quase que uma certeza para os pacientes com astrocitomas (Rao, 2003; Behin *et al*, 2003). Os astrocitomas geralmente apresentam altas taxas de invasão local, que resulta no seu re-aparecimento no mesmo local de onde foi previamente retirado (Giese *et al*, 1996). Os astrocitomas de maior grau (grau IV ou GBMs) são também o tipo mais frequente de tumores primários de cérebro em adultos, representando cerca de 39% de todos os tumores cerebrais (Osborne *et al*, 2001; Cordes *et al*, 2003). Os GBMs podem ser ditos multiformes em vários aspectos:

macroscopicamente por apresentar regiões de necrose e hemorragia; microscopicamente por apresentarem núcleos e células pleomórficos e proliferação microvascular e geneticamente por apresentarem vários tipos de deleção, ampliações e mutações de ponto (Holland, 2000).

Apesar das pesquisas intensivas na área, o prognóstico para pacientes com gliomas malignos permanece ainda muito ruim (JAMA, 2005). Por razões ainda não esclarecidas, a incidência de gliomas malignos parece estar aumentando entre pessoas de idade mais avançada (Behin *et al*, 2003). Em um estudo da epidemiologia dos gliomas, Osborne *et al* (2001) revelam que há pouca variação na incidência dos gliomas entre países, culturas ou regiões distintos, bem como não há padrões de mudanças em grupos migrantes. As variações detectadas dizem respeito apenas ao acesso ao diagnóstico e tratamento. Já foi descrito que tumores que apresentam a mesma morfologia podem ser geneticamente diferentes e podem apresentar desenvolvimentos diversos, apesar de terem prognósticos semelhantes. Em função disto está surgindo um consenso de que análises genéticas e moleculares logo se tornarão um critério tão importante quanto a morfologia para melhorar a classificação dos gliomas (Behin *et al*, 2003).

Pode-se perceber quão complexo é o processo tumoral, por isso é preciso estar atento para o maior número possível de variáveis para compreensão dos mecanismos que levam à tumorigênese. Para realização de estudos *in vitro*, é cada vez mais patente a importância de se reproduzir com o máximo de fidelidade o ambiente *in vivo*. Para tanto, além das células em cultura em condições fisiológicas e dos nutrientes necessários para que se mantenham vivas, é preciso recuperar, tanto quanto possível, a “arquitetura” do órgão de origem das células a serem estudadas (Ramirez & Rifkin, 2003); passemos então a tratar deste microambiente chamado matriz extracelular (MEC).

1.3 Interações célula-matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é definida como uma mistura heterogênea de macromoléculas (incluindo colágenos e glicoproteínas não colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos) capaz de se automodelar propiciando suporte mecânico

para células e tecidos. A MEC deixou de ser vista apenas como suporte mecânico, mas também como fonte de informações e como reservatório de fatores de crescimento que atuam cooperativamente para regular a ampla variedade de processos celulares (Pupa *et al*, 2002; Itoh & Nagase, 2002; Ramirez & Rifkin, 2003).

Cada tipo celular apresenta determinados receptores para o seu microambiente e as interações destes receptores com a MEC influenciam a forma, o desenvolvimento e a resposta celular a moléculas solúveis, incluindo citocinas e fatores de crescimento, assim como descrito no clássico modelo de reciprocidade dinâmica de Lin & Bissell, 1993. É ainda amplamente descrito que a MEC, dependendo de seu contexto, regula processos celulares distintos como o crescimento, morte, adesão, migração, invasão, expressão gênica e diferenciação. Tais eventos celulares regulam processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual, angiogênese e também, transformação e metástases em processos patológicos (Ingber & Folkman, 1989; Juliano & Haskill, 1993; Bissell *et al*, 2002; DeClerk *et al*, 2004).

Os maiores componentes da MEC como laminina, fibronectina e colágeno são pouco detectáveis próximos a neurônios e células da glia no sistema nervoso central (SNC) (Sanes, 1989). A MEC do SNC é dominada por uma diversidade de moléculas de proteoglicanos do tipo condroitin sulfato, ácido hialurônico e outras glicoproteínas multiméricas do tipo tenascina.

A MEC do SNC também atua como um reservatório de fatores que promovem a proliferação, diferenciação e migração celulares. Entre estes fatores, alguns dos mais versáteis são os ativadores de plasminogênio e as metaloproteases (MMPs), capazes de degradar os componentes da MEC, incluindo proteoglicanos e tenascina, bem como fibronectina e laminina (Vaday & Lider, 2000). As MMPs atuam em exemplos fisiológicos clássicos como o cone de migração do crescimento axonal e a neuritogênese, mas também estão associadas aos processos de invasão tumoral (Romanic & Madri, 1994).

O microambiente é capaz de exercer controle tanto sobre as células tumorais como as normais. Caso o genoma de células diferenciadas tivesse completa autonomia não haveria especificidade tecidual, e células isoladas continuariam a

desempenhar suas funções em culturas celulares da mesma maneira que no seu órgão de origem. Isto não é o que acontece na prática: sabe-se que células isoladas perdem a maioria das suas funções diferenciadas quando separadas e colocadas em culturas tradicionais. Porém, a identidade celular não é perdida; já se sabe que modulando o ambiente das células em cultura é possível recuperar várias das suas características tecido-específicas (Bissell & LaBarge, 2005).

Em carcinomas invasivos, durante a transição do tecido normal para o tumoral, o microambiente célula-estroma atua ativamente produzindo uma membrana basal lesada por onde a célula tumoral atravessa e invade outro tecido. A degradação da MEC, que funciona como uma barreira física, é um mecanismo crucial para o crescimento tumoral, invasão do parênquima, metástase e angiogênese. (Itoh & Nagase, 2002; Span *et al*, 2003). Análises citoquímicas, moleculares e bioquímicas demonstraram que os fatores que atuam no balanço homeostático da interação célula-MEC incluem, por exemplo, o fator de crescimento transformante, o TGF- β , fatores de crescimento epidérmico (EGF), citocinas e interleucinas (IL-6), fator de crescimento hepático (SF-HGF), fatores angiogênicos, por exemplo, fator de crescimento do endotélio vascular VEGF e o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), metaloproteases (MMPs) e ativadores de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) (Liotta & Kohn, 2001; Wang *et al*, 2002).

Além dos fatores supra citados, a própria arquitetura dos componentes insolúveis da MEC parece influenciar tanto nas propriedades estruturais como na sinalização proveniente do tecido conectivo (Ramirez & Rifkin, 2003). Todos estes fatores atuam induzindo e selecionando a expansão de células neoplásicas.

A progressão maligna de tumores está relacionada com a expressão de oncogenes e a perda da expressão de genes supressores de tumor (Weinberg, 1991; Evdokiiou & Cowled, 1998; Noel & Foidart, 1998). No entanto, carcinomas são infiltrados também por células hospedeiras (fibroblastos, células endoteliais, células inflamatórias) e circundados por matriz extracelular, a qual é extensivamente remodelada. Os componentes da MEC e as células hospedeiras infiltradas

promovem um microambiente tecidual que condiciona tanto a progressão tumoral quanto o processo de metástase. (Noel & Foidart, 1998).

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares. Tais famílias incluem as serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteases dependentes de zinco (MMPs). MMPs compreendem um grupo em contínuo crescimento de enzimas proteolíticas que, de acordo com a especificidade do substrato e a homologia de domínios, são subdivididas em collagenases, gelatinases, estromelisinases e MMPs do tipo membrana (Benaud *et al*, 1998).

1.4 As metaloproteases da MEC

Um grande número de genes de MMPs, mais de 20, foram identificados em humanos, muitas das quais estão implicados em câncer. A degradação da MEC por MMPs não apenas facilita a invasão tumoral mas, também, afeta o comportamento da célula tumoral e conduz a progressão do câncer (Itoh & Nagase, 2002; Rao, 2003; Takino *et al*, 2004).

Através da degradação proteolítica ou ativação de moléculas de superfície celular e de proteínas da MEC, as MMPs podem modular tanto as interações célula-célula como célula-matriz, que influenciam na diferenciação, migração, proliferação e sobrevivência (Baker *et al*, 2002). Além dos substratos da MEC descritos inicialmente, os alvos proteolíticos das MMPs aumentaram e abrangem muitas outras proteínas extracelulares. Estes substratos incluem uma gama de outras proteinases, inibidores de proteinases, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento latentes, proteínas ligantes de fatores de crescimento, receptores de superfície celular e moléculas de adesão célula-célula e célula-matrix (Coussens *et al*, 2002). É patente o papel que das MMPs na atividade angiogênica e sua participação nos primeiros estágios da tumorigênese e do crescimento do tumor primário. Estudos em humanos mostram uma associação direta entre aumento da expressão de MMPs e invasividade tumoral, desenvolvimento de metástases e baixa taxa de sobrevivência (Mysliwiec & Ornstein, 2002).

A atividade das MMPs é regulada por inibidores endógenos como α -2 macroglobulina, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs - Tissue inhibitor of metalloproteinase), pequenas moléculas com domínios "TIMP-like" e pela glicoproteína de membrana recentemente descrita, RECK. As TIMPs inibem as MMPs de uma forma seletiva, mas reversível, com estequiometria de 1:1 molécula (Chang & Werb, 2001). Existem quatro tipos de TIMPs identificadas: TIMP-1 que inibe colagenase, estromelina-1 e as formas ativas e inativas de MMP-9 (gelatinase B); TIMP-2 que inibe a secreção de pró-MMP-2 (gelatinase A), ao mesmo tempo que ativa esta enzima na presença de MT1-MMP (MMP-14); TIMP-3, que ao contrário das três outras formas que são solúveis, está associada com a MEC e inibe a secreção de pró-MMP-2/-9 e TIMP-4 que inibe pró-MMP-2 (Woodhouse *et al*, 1997; Baker *et al*, 2002; Bernardo & Fridman, 2003; Shiomi & Okada, 2003).

Níveis elevados de diferentes MMPs podem ser detectados nos tecidos tumorais ou no soro de pacientes com câncer avançado e seu papel como indicador de prognóstico em câncer vem sendo estudado. Uma abordagem que foi utilizada na tentativa de prevenção e/ou contenção de metástases é o uso de inibidores sintéticos de MMPs, os MPIs, tais como batimastat, marimastat ou Ilomastat (Rasmussen & McCann, 1997; Fassina *et al*, 2000; Munshi *et al*, 2004). Um dos fatores que contribuíram para o insucesso desta abordagem foi a falta de conhecimento de outras funções das MMPs além da degradação da MEC. O espectro de atividades biológicas que se atribui às MMPs hoje é impressionante: MMPs podem regular morte celular, proliferação celular, diferenciação, angiogênese associada ao tumor e a conversão maligna (Coussens *et al*, 2002).

Os GBMs frequentemente apresentam elevação nos níveis de várias MMPs, em particular MMP-2 e MMP-9 são críticas na invasão dos gliomas (Cordes *et al*, 2003; Rao, 2003).

Recentemente foi mostrado que as funções e expressão de proteases são fortemente influenciadas pelo estado funcional e pelas propriedades de sinalização das integrinas. As integrinas são receptores transmembranares que reconhecem e se ligam a moléculas específicas da MEC e assim iniciam a transdução de sinal com

ativação de estruturas de adesão associadas ao citoesqueleto de actina (Martin *et al*, 2002).

Em estudo de Rooprai *et al*, 1998, através de co-expressão de MMP e determinadas integrinas foi mostrado que existe uma intersecção na atuação destas duas moléculas. Uma significativa inibição do processo de invasão de gliomas foi observada em ensaios que utilizaram inibidores de proteases (TIMP-1) e antisoro anti integrina.

Em trabalho recente Cordes *et al* (2003) demonstraram a co-localização de MMP-2 e das β_1 -integrinas em regiões específicas da membrana, chamadas adesões focais, nas linhagens de glioma A172, U138, LN-229 e LN-18. No mesmo trabalho ficou evidente que para as linhagens A172 e U138, a depleção de β_1 e β_3 integrinas, através de RNAi, causou um forte decréscimo na atividade de MMP-2; esses dados sugerem haver uma ligação entre os mecanismos de ação destas integrinas e da MMP-2.

Apesar de todo avanço da cirurgia, radioterapia e quimioterapia bem como os testes com novas drogas, não existe ainda uma terapia efetiva para o tratamento dos gliomas (Maher *et al*, 2001; Behin *et al*, 2003). Neste aspecto, a família das metaloproteases (MMP) e seus inibidores endógenos (TIMPs) estão envolvidos em regulação de vários passos cruciais no processo de carcinogênese, estando envolvidos nos processos de malignidade de gliomas (Rooprai *et al*, 1998).

As MMPs não são produzidas apenas pelo epitélio maligno mas, também, pelo estroma adjacente, sugerindo um importante papel da interação célula-célula (Singer *et al*, 2002; DeClerk *et al*, 2004). As MMPs são produzidas por células do estroma reativo recrutadas para o ambiente neoplásico; na verdade, o aumento da quantidade de MMPs é majoritariamente produto da resposta do hospedeiro induzida pelo tumor (Coussens *et al*, 2002).

A diferença entre as estruturas dos tecidos normal e doente sugere que para o desenvolvimento de modelos experimentais visando o estudo da biologia humana normal comparada à progressão do tumor associado, o ambiente celular é de extrema importância. Idealmente, o 'design' do modelo deveria recapitular tanto

a organização tridimensional como a função diferenciada de um dado órgão e, ao mesmo tempo, permitir a intervenção experimental (Schmeichel & Bissel, 2003).

O entendimento dos pontos-chave das relações entre os receptores de adesão, migração e proliferação entre célula-célula e célula-matriz extracelular pode proporcionar bases para a bioengenharia, como em processos de reparos e reconstrução tridimensional de tecidos lesados. Tal entendimento pode ser gerado através de utilização de modelos tridimensionais *in vitro*, os quais realmente mimetizam o microambiente celular, propiciando o desenho de estratégias efetivas para cura de doenças e de biomateriais terapêuticos mais eficientes (Damsky, 2002; Roskelley & Bissel, 2002).

Tendo em vista o grau de participação e os diversos papéis que as MMPs desempenham na progressão tumoral, e, sabendo que até o momento os testes clínicos com inibidores sintéticos destas enzimas não produziram resultados animadores, parece natural que se dê especial atenção aos inibidores naturais das MMPs. Já está demonstrado por vários grupos que ensaios de super expressão de *TIMPs*, os inibidores endógenos de MMPs, reduziram o aparecimento de metástase (Coussens *et al*, 2002). A super expressão de *TIMP-2* em células do endotélio microvascular humano (hMVECs) resulta em inibição da migração. *TIMP-2* é um membro ímpar da família das *TIMPs* pois, além de mediar a ativação da pró-MMP-2 através de MT1-MMP, ainda apresenta um receptor de superfície celular que media diretamente a inibição do crescimento. Neste mesmo modelo ficou demonstrado que *TIMP-2* induz um aumento de cerca de 3 vezes na expressão de *RECK*. (Oh *et al*, 2004). O gene *RECK*, descrito por Takahashi *et al*, em 1998, caracterizado por inibição de tumor e metástase, age regulando pelo menos três diferentes MMPs: MT1-MMP (ou MMP-14), MMP-2 e MMP-9, sendo que as duas últimas comumente aparecem com atividade aumentada em tumores, incluindo gliomas (Wang *et al*, 2003). O gene *RECK*, por ser uma molécula inibidora de MMP, tem sido apontado como nova estratégia para regulação da função destas enzimas durante os processos malignos onde a degradação da MEC é o fator determinante da invasão tumoral (Rhee & Coussens, 2002; Sasahara *et al*, 2002). Vamos então

olhar mais de perto para este gene e entender melhor sua relação com estas enzimas chave no desenvolvimento e progressão tumorais.

1.5 O gene supressor de tumor *RECK*

O gene *RECK* (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) foi descrito por Takahashi *et al*, 1998, através de rastreamento de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano normal transfectados em células NIH 3T3 transformadas com v-Ki-ras que geravam colônias normais devido à apresentação de morfologia achatada.

O gene *RECK* é expresso em diversos tecidos humanos normais, porém, sua expressão é reprimida ou diminuída durante a transformação celular, uma vez que a expressão deste gene não foi detectada em inúmeras linhagens tumorais analisadas (Takahashi *et al*, 1998). A expressão constitutiva do gene *RECK* em células malignas, incluindo HT1080, B16, SW48, A549, HeLa, e A673, resulta em supressão da atividade invasiva e metastática destas células.

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

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

Uma das características exclusivas de RECK que a torna um novo tipo de inibidor de MMPs, é o fato de a proteína RECK apresentar um domínio GPI e,

portanto estar localizada na membrana, diferentemente da TIMPs que são secretadas (Oh *et al*, 2001). Várias MMPs têm alvos na região pericelular, seja por alguma âncora diretamente na membrana ou por receptores ou ainda por proteínas ligantes na superfície celular, criando assim uma região de alta atividade proteolítica. Este área com ação proteolítica concentrada pode funcionar para a invasão celular bem como na sinalização localizada de fatores de crescimento por interações com moduladores ligantes da MEC. Além disso, a ativação de algumas MMPs requer interação com outras MMPs associadas à membrana (MT-MMPs). Essa necessidade está bem ilustrada no processo de ativação da MMP-2: TIMP-2 liga-se a pró-MMP-2 à MT1-MMP; uma segunda molécula de MT1-MMP cliva uma porção do pró-domínio de MMP-2 para liberar a sua forma intermediária; outra clivagem do pró-domínio de MMP-2 por outra MMP associada à membrana resulta na forma ativa da MMP-2, como mostra o esquema da figura 1 (Welm *et al*, 2002). Pelo fato de RECK estar localizada na região pericelular sua atividade inibitória pode ser potencializada.

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

Figura 1: RECK modula a ação de MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9 através de vários mecanismos. Retirado e adaptado de: Welm *et al*, 2002 Current Biology

Se a expressão de RECK for restaurada em células malignas, a supressão da capacidade invasiva associada ao decréscimo da secreção de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP é observada, conforme revisado por Sasahara *et al*, 2002 e, portanto, correlaciona-se a expressão da proteína à contenção de invasão e metástases tumorais. Desta forma, este gene apresenta-se como importante regulador do remodelamento da MEC e sua inibição provoca uma atividade excessiva das MMPs, promovendo invasão, metástase e angiogênese (Noda *et al*, 2003).

Recentemente, foi descrita a expressão de mRNA de *RECK* em hepatocarcinomas celulares e em tumores de pâncreas. Em 40% e 52% dos casos, respectivamente, a expressão de *RECK* foi maior em tecidos tumorais do que em não tumorais, entretanto, tais tumores apresentaram uma tendência de menor invasividade acompanhado de maior sobrevivência dos pacientes (Furomoto *et al*, 2001; Masui *et al*, 2003).

Clinicamente, para pacientes com carcinoma mamário que apresentavam maior nível de mRNA de *RECK*, o tempo de sobrevivência sem recorrência do tumor foi de 91,2 meses; já para os pacientes com tumores apresentando menor nível de mRNA de *RECK* o tempo diminuía para 80,4 meses (Span *et al*, 2003). Esses resultados sugerem que *RECK* possui um potencial valor como gene marcador de melhor prognóstico para o câncer.

Assim, a literatura de casos clínicos gerada até o presente momento relata a possibilidade de utilização deste gene como marcador molecular para prognóstico de tumores do tipo carcinoma pancreático, mamário, hepatocarcinoma, pulmão, cólon-retal e miofibroblastos e até mesmo como terapia gênica em doenças degenerativas, como a artrite reumatóide (Baker *et al*, 2002; Rhee & Coussens, 2002; Liu *et al*, 2002; Chung *et al*, 2003; Span *et al*, 2003; Masui *et al*, 2003; Takenaka *et al*, 2004; Takeuchi *et al*, 2004; Echizenya *et al*, 2005).

A análise da função fisiológica da proteína RECK através da geração de camundongos “Knock-out” tem também revelado a sua importância para o desenvolvimento embrionário uma vez que os camundongos *RECK* *-/-* sofrem morte precoce na fase embrionária (Oh *et al*, 2001).

Camundongos que não expressavam o gene *RECK* morriam aos 10 dias de desenvolvimento embrionário, apresentando defeitos em fibrilas de colágeno, lâmina basal e no desenvolvimento vascular, sendo que este fenótipo foi parcialmente observado em ensaios de mutação nula de MMP-2. O crescimento vascular também foi drasticamente suprimido em tumores derivados de células de fibrosarcoma, que expressavam *RECK*, quando crescidos em ratos do tipo nude (Oh *et al*, 2001).

Estes resultados suportam a idéia do papel do gene *RECK* na regulação de MMP-2 e sua implicação, se reprimido, na angiogênese vista em tumores.

Durante o desenvolvimento embrionário, os resultados sugerem que, *RECK* tenha também um papel importante como regulador de metaloproteases, inibindo a atividade das mesmas e propiciando, desta forma, o acúmulo necessário de colágeno para um desenvolvimento embrionário normal (Oh *et al*, 2001).

Embora *RECK* seja um gene recentemente descrito (Takahashi *et al*, 1998), toda literatura gerada até o presente momento relata a possibilidade de utilização deste gene como marcador molecular para prognóstico de tumores do tipo hepatocarcinoma, tumores de mama e até mesmo como terapia gênica em doenças degenerativas (Baker *et al*, 2002; Liu *et al*, 2002; Chung *et al*, 2003). Portanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na inibição da expressão do gene *RECK* poderá permitir o desenvolvimento de estratégias para restaurar sua expressão em células tumorais, suprimindo assim, o comportamento maligno destas células.

Estudos que conjuguem culturas de células em diferentes substratos de MEC visando ter acesso às respostas das interações entre célula-célula e célula-MEC podem propiciar respostas quanto aos mecanismos de invasão tumoral.

Duas linhagens celulares de gliomas humanos foram descritas por apresentarem características especiais em substratos de matriz extracelular: T98G, uma linhagem invasiva, enquanto A172, não invasiva.

O caráter invasivo das células T98G está associado a grande produção de enzimas do tipo MMP-2, além de apresentar outras características ausentes na linhagem A172, como maior taxa de crescimento, melhor espalhamento em Matrigel, níveis mais baixos de TIMP e maior mobilidade (Nakagawa *et al*, 1996). A linhagem T98G também expressa o oncogene *c-myc*, o que sugere que este possa ser um dos fatores relacionados à invasividade (Nakagawa *et al*, 1996).

Estas características indicam que tais linhagens celulares sejam interessantes para caracterização da expressão do gene *RECK*, uma vez que este gene regula a atividade de MMP-2 e 9, segundo a primeira publicação de *RECK* (Takahashi *et al*, 1998).

2. Objetivo geral

O objetivo deste projeto é avaliar a participação do gene *RECK* no processo de invasão, comparando linhagens invasivas (T98G) e não invasivas (A172) de gliomas humanos, cultivadas em ambientes biomiméticos tridimensionais de colágeno tipo I e Matrigel™ (membrana basal reconstituída); dada a ação deste gene como inibidor do processo de invasão através da modulação da atividade das metaloproteases MMP-2 e MMP-9 que degradam colágeno tipo IV.

A abordagem utilizada neste trabalho pretende responder a duas questões centrais: se o gene *RECK* apresenta maior expressão na linhagem de caráter menos invasivo e, portanto se *RECK* participa do processo invasivo em gliomas; e como os diferentes substratos de cultivo (plástico, colágeno e matrigel) alteram a expressão deste gene; utilizando as técnicas descritas a seguir.

3. Objetivos específicos

3.1 Obtenção de gel hidratado de colágeno tipo I

O colágeno foi extraído dos tendões de cauda de ratos através do método descrito por Schor, 1980 e adaptado por Maria & Wada, 1996. O colágeno tipo I, elemento abundante na matriz extracelular, será utilizado como substrato para cultivo celular, criando um ambiente biomimético; uma vez que segundo Oh *et al*, 2001, a ausência da atividade do gene *RECK*, vista em camundongos Knock-out (*RECK* -/-), resulta em severo desarranjo dos tecidos mesenquimatosos levando à falência do processo de organogênese, além de desagregação e alteração no diâmetro das fibrilas de colágeno tipo 1. Além disso, Mareel & Leroy (2003) relatam que para células de vertebrados o gel de colágeno tipo 1 é frequentemente utilizado para avaliação de invasão.

3.2 Avaliação da influência do substrato no crescimento das linhagens A172 e T98G

A proliferação celular das diferentes linhagens, T98G e A172, será acompanhada quando cultivadas em Matrigel™, colágeno e plástico (controle), através de curvas de crescimento.

3.3 Avaliação do caráter invasivo das linhagens A172 e T98G nos diferentes substratos

O processo de invasão das linhagens nos diferentes substratos foi investigado através de inclusão das células cultivadas em MEC, seja colágeno tipo I ou matrigel, em parafina que posteriormente serem cortadas em micrótomo e ultramicrotomo. Através de imunohistoquímica, será avaliada a presença da proteína RECK e correlacionada com o grau de invasão das duas linhagens em questão.

3.4 Avaliação da expressão do gene *RECK*

A partir das células cultivadas em plástico, colágeno tipo I e Matrigel™ serão obtidos lisados contendo mRNAs, que através do ensaio de PCR em tempo real poderá ser confirmado como produto da expressão do gene *RECK*. A expressão do gene *RECK* humano foi relacionada com a invasividade e o potencial metastático das linhagens de glioma escolhidas. O ensaio de Northern blot, realizado paralelamente aos ensaios de PCR em tempo real, gerou resultados semelhantes aos obtidos através da técnica de PCR em tempo real.

3.5 Avaliação da atividade de MMPs

Como o aumento da atividade das metaloproteases está associado aos tumores e como estas enzimas são reguladas pelo gene *RECK*, foram realizados ensaios de zimografia para avaliar se há diferença na atividade destas enzimas entre as linhagens do modelo, a fim de relacionar os níveis de atividade de MMPs com o comportamento invasivo e com os níveis de expressão de *RECK*. Além disso,

este ensaio pôde correlacionar a influência dos substratos de matriz na atividade de MMPs.

4. Material e Métodos

4.1 Preparos de substratos de matriz extracelular

O colágeno foi obtido na forma de gel hidratado e estéril, proveniente de extração de colágeno tipo I de tendão de cauda de ratos Wistar, segundo Maria & Wada, 1996. Foram realizados sete ensaios de extração de colágeno. Obteve-se um volume total de aproximadamente 200mL antes da realização dos ensaios de crescimento, sendo feito um “pool” destas extrações para garantir a uniformidade do substrato entre os ensaios. A determinação da concentração foi obtida através da liofilização do gel hidratado, pesando-se o material seco e ressuspendendo-o novamente em ácido acético 0,034M, de modo que a concentração final de colágeno fosse 2,5 mg/mL. Após a reconstituição do colágeno em ácido acético, realizou-se nova diálise (48 horas, com duas trocas diárias de água, volume de água sendo 10X o volume do gel) para troca do ácido acético por água. Antes do uso do gel realizou-se um teste de polimerização, onde é adicionado DMEM 10x concentrado. Como o meio de cultura possui vermelho de fenol, através da cor do gel polimerizado pode-se verificar a neutralidade de seu pH.

O substrato Matrigel™ consiste de uma mistura de diferentes elementos de MEC, sendo uma preparação de membrana basal extraída de sarcoma de rato. É composto de laminina em sua maioria, seguido de colágeno tipo IV, proteoglicanos, entactina, nidogênio, TGF-alfa, ativador plasminogênico tecidual entre outros fatores de crescimento. O Matrigel™ foi adquirido da empresa Becton Dickinson, MA, USA (Cat. No. 354234) e também em parte doado pelo Dr. Matthew Hoffman NIH/NIDC - USA, também produzido pela BD.

4.2 Cultivo celular

Linhagens celulares de gliomas humanos:

A172 (ATCC #CRL 1620) - glioblastoma cerebral humano, com propriedade aderente, apresenta comportamento não invasivo segundo Nakagawa *et al*, 1996.

T98G (ATCC #CRL 1690) - glioblastoma multiforme cerebral humano, com propriedade aderente e morfologia semelhante a fibroblasto, com potencial altamente invasivo quando cultivado em matrigel segundo Nakagawa *et al*, 1996.

STR9 - Clone celular originário da linhagem ST1 de rato estavelmente transfectada com vetor pCXN2-hRECK.

As linhagens de glioma humano utilizadas como modelo para este estudo foram gentilmente doadas pelo laboratório da Prof^a. Mari Cleide Sogayar (IQ-USP). Ambas as linhagens, A172 e T98G, foram expandidas para gerar um estoque inicial em uma única passagem.

As linhagens celulares de gliomas A172 e T98G foram cultivadas em frascos plásticos descartáveis contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium; Gibco BRL) suplementadas com soro fetal bovino a 10% (Cultilab Materiais) e antibióticos (25 mg/mL de ampicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). O pH e a temperatura são mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de umidade. As células foram subcultivadas sempre que atingiam, aproximadamente, 80-90% da densidade de saturação, utilizando tripsina 0,1% (ICN Pharmaceuticals Inc.; Gibco) em PBSA contendo 1mM EDTA e tendo sido a cultura previamente lavada com solução de PBSA. Os estoques celulares são congelados em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido), e mantidos a -190°C, em tanque de nitrogênio líquido.

4.3 Curvas de crescimento

As duas linhagens celulares, A172 e T98G, foram plaqueadas em placas de 24 poços descartáveis na seguinte proporção: $1,0 \times 10^4$ células/poço e as culturas foram mantidas em estufas a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂. Foram utilizados três diferentes tipos de substrato para as curvas de crescimento: plástico (controle), gel de colágeno tipo I (175 µL/poço, 2,5 mg/mL) e Matrigel (75 µL/poço, 8,5 mg/mL). O meio de cultura foi renovado no terceiro dia após o plaqueamento, e a cada 24 horas a partir deste dia. Nos dias 1, 3, 5 e 7 de cultivo, triplicatas das culturas de cada linhagem celular foram coletadas através de tripsinização e fixadas em solução 3,7% formaldeído-PBS para posterior contagem. Para a condição de cultivo em gel de colágeno tipo 1, para a coleta das células foi utilizada solução de collagenase (Sigma) juntamente com a tripsina. No caso do cultivo em Matrigel, para coleta foi utilizada solução de Versene (PBSA + 5mM EDTA) adicionada à tripsina.

A contagem das suspensões de células foi realizada em câmaras de Neubauer; e os gráficos foram feitos utilizando o Microsoft Excell.

4.4 Cortes histológicos e microscopia eletrônica

As duas linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços descartáveis na seguinte proporção: $1,0 \times 10^4$ células/poço, sendo que cada poço era recoberto por 1mL de gel de colágeno tipo 1 [2,5 mg/mL], e as culturas foram mantidas por 7 dias em estufas a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂. Após este período, o material foi fixado em solução de Karnovsky (Glutaraldeído 2,5% - paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen pH 7,4) e enviado para o laboratório do Professor Sebastião R. Taboga, Laboratório de Microscopia e Microanálises do Departamento de Biologia do IBILCE- UNESP, em São José do Rio Preto para processamento dos cortes e aquisição de imagens.

O material foi incluído em parafina Histotec (Merck). Foram feitos cortes de 5 a 7µm em micrótomo rotativo semi-automático Leica (Alemanha). Depois de desparafinizados e hidratados, os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina,

segundo método de Behmer *et al* (1976) ou com azul de toluidina para realização de estudos morfológicos. As imagens de microscopia de luz foram obtidas pelo software Image Pro Plus (Media Cybernetics) com auxílio de câmera CCD-IRIS (Sony), acoplados ao microscópio Olympus BX-60.

Para a microscopia eletrônica de transmissão os fragmentos do material foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, desidratados em série crescente de acetona e insluídos em araldite. Cortes ultra-finos foram feitos em ultra-micrótomo Leica, com navalha de diamante, colhidos em "grid" de cobre de 200 mesh, e foram contrastados pelo citrato de chumbo e acetato de uranila, método convencional de contrastação de material para microscopia eletrônica de transmissão. O material foi analisado e documentado em microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss 910, no Centro de Microscopia Prof. Dr. Celso Abbade Mourão, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto.

4.5 Northern-blot e PCR em tempo real

4.5.1 Preparação de RNA total

As duas linhagens celulares foram plaqueadas em placas de Petri com 100 mm de diâmetro, sendo plaqueadas $3,0 \times 10^5$ células/placa 100mm. As coletas foram realizadas nos dias 3 e 7 de cultivo, no laboratório da Professora Mari Sogayar, IQ-USP. Para a coleta removeu-se o meio, lavaram-se as células por 3 vezes com PBSA, drenando o excesso de líquido sobre um papel toalha. Após a lavagem, adicionou-se 1 mL de solução de lise (isotiocianato de guanidina 4M + citrato de sódio 25mM + 7 μ L de β mercaptoetanol 4,4 mM) sobre a camada de células e, com auxílio de uma espátula raspou-se toda a camada celular; transferiu-se o lisado para um tubo devidamente rotulado e este lisado foi imediatamente armazenado em freezer -80 °C. A purificação do RNA foi feita por ultracentrifugação com cloreto de cézio (Chirgwin *et al*, 1979) em ultracentrífuga Beckman L8-80M rotor SW50.1, a 37000 rpm. Acrescentou-se 1,5 mL de CsCl_2 por tubo da ultracentrífuga e adicionou-se lentamente sobre a solução de CsCl_2 o lisado, deixando escorrer pela parede do tubo. A centrifugação foi feita por 16-18

horas. Após a centrifugação, removeu-se o líquido sobrenadante com pipeta Pasteur e emborcaram-se os tubos sobre papel toalha. Após o procedimento padrão, adicionaram-se 20 μL de água milli-Q autoclavada por tubo para ressuspender o RNA. A quantificação dos RNAs foi realizada em espectrofotômetro sendo feitas leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após a quantificação espectrofotométrica, a qualidade dos RNAs pode ser verificada em gel de agarose-formaldeído.

Foram considerados de boa qualidade os RNAs que apresentaram uma razão da absorbância 260/280nm com valores próximos de 2. Nos géis de agarose-formaldeído pode-se confirmar a quantificação do espectrofotômetro e a relação das bandas 18S e 28S. A banda correspondente à fração 28S idealmente deve apresentar o dobro da intensidade da banda correspondente à fração 18S, uma vez que a molécula correspondente à fração 28S que incorpora uma quantidade maior de brometo de etídio. Com os RNAs obtidos foram realizados dois ensaios de Real time PCR e estocados para realização dos ensaios de Northern blot. Como controles internos foram usados primers para os genes constitutivamente expressos *GAPDH* e *tubulina*. Como controle positivo foi utilizada a linhagem STR9, que super-expressa o gene *RECK*.

4.5.2 Preparação dos cDNAs para PCR em tempo real

O primeiro passo consistiu em tratar os RNAs extraídos com DNase I (Invitrogen) para eliminar contaminação por DNA genômico. Em seguida realizou-se uma transcrição reversa utilizando oligo-DT (500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Amersham) juntamente com random primers (100ng/ μL , Amersham). A enzima utilizada foi a SuperScript II (200U/ μL , Invitrogen), além de RNase OUT (Invitrogen) para evitar a degradação do RNA template. Ao final da transcrição reversa adicionou-se RNase H (5 U/ μL , USB). Adicionaram-se 40 μL de TE por tubo de reação, tendo assim cDNAs numa diluição 1:3. Armazenaram-se os RNAs em freezer -80°C.

4.5.3 Reação de PCR em tempo real

Para a reação de Real Time PCR dilui-se novamente os cDNAs obtidos, para uma diluição final 1:60. As reações foram feitas no volume final de 12µL, contendo 3 µL da mistura de um dos pares de primers Foward (F) e Reverse (R) de cada gene, 3 µL de cDNA proveniente do RT-PCR na diluição 1:60 e 6 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

Foram utilizados primers do gene de interesse *RECK* humano, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-14* (*MT1-MMP*), *TIMP-2* e como controles internos os primers dos genes *GAPDH* e *Tubulina*. As seqüências dos primers utilizados estão na tabela 2.

Gene	Seqüência
<i>h-Tubulina</i>	F: TCAACA CCT TCT TCAGTGAAACG
	R: AGTGCCAGTGCGAACTTCATC
<i>h-GAPDH</i>	F: ACCCACTCCTCCACCTTTGA
	R: CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<i>h-RECK</i>	F: TGCAAGCAGGCATCTTCAAA
	R: ACCGAGCCCATTTCATTTCCTG
<i>h-MMP-2</i>	F: AGC TCC CGG AAA AGA TTG ATG
	R: CAG GGT GCT GGC TGA GTA GAT
<i>h-MMP-9</i>	F: CCT GGA GAC CTC AGA ACC AAT C
	R: GAT TTC GAC TCT CCA CGC ATC T
<i>h-MMP-14</i>	F: GCA GAA GTT TTA CGG CTT GCA
	R: TCG AAG ATT GGC CTT GAT CTC
<i>h-TIMP-2</i>	F: CGA CAT TTA TGG CAA CCC TAT CA
	R: GGG CCG TGT AGA TAA ACT CTA TAT CC

Tabela 2: Seqüências dos “primers” utilizados nas reações de PCR em tempo real. Todas as seqüências estão escritas na orientação 5’ – 3’.

O ensaio de Real time PCR foi realizado no aparelho Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE - Applied Biosystems) do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. As condições utilizadas para o ensaio foram as seguintes:

desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 1 minuto.

4.6 Zimografia

O protocolo utilizado para este ensaio foi descrito por Kato *et al*, 2002. As células A172 e T98G foram plaqueadas em placas de 24 poços, com número inicial $1,0 \times 10^5$ células/poço e, ao atingir 80% de confluência foram carenciadas com meio DME contendo 0,1% BSA. Após 48 horas de carenciamento o meio sobrenadante foi coletado e centrifugado por 2X a 800 rpm a 4°C. O sobrenadante teve o teor protéico quantificado pelo método colorimétrico de Lowry (1951). Foram aplicados 25 µg de proteína por poço num gel 8% acrilamida contendo 1 mg/mL de gelatina. A corrida foi feita por 30 minutos a 50V e 20 mA, para empacotamento das amostras e por mais 90 minutos a 100V e 20 mA. Lavou-se o gel 2X de 15 minutos com Triton 2,5% a 37°C. Lavou-se novamente o gel 2X, 1 minuto cada lavagem, com tampão de incubação (0,05 M TrisHCl pH8 + 5mM CaCl₂ + 5 µM ZnCl₂). Incubou-se o gel por 16-17 horas no tampão de incubação a 37°C, em recipiente fechado. Os controles usados para confirmar a presença de MMPs foram Ilomastat (Chemicon - GM6001) na concentração de 0,5mM, no tampão de incubação e EDTA 0,5 mM, segundo Souza *et al*, 2001. Os géis foram corados com 0,5% Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) por 30 minutos, sob agitação. Descorou-se o gel com 10% metanol + 10% ácido acético sob agitação, trocando a cada 15 minutos, até que as bandas aparecessem. A captura de imagem e análises foram feitas no densitômetro GS-700 BioRad. O ensaio foi feito em quadruplicata e os dados estão expressos por média e desvio padrão.

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Graph Pad Instat, usando o teste de Tukey para comparação das amostras e o teste One-way ANOVA, para garantir que a ocorrência dos eventos não é ao acaso.

5. Resultados obtidos

5.1 Curvas de crescimento

Foram obtidas as curvas de crescimento nos três diferentes substratos para as duas linhagens celulares deste estudo, A172 e T98G. Pode-se observar, na tabela 3 e também na figura 2, que a linhagem T98G de caráter mais invasivo, prolifera mais rapidamente quando comparada à A172, descrita como não invasiva, reforçando os dados de Nakagawa *et al* (1996) e o que relata o banco de células americano ATCC. Como a linhagem T98G é derivada de um glioblastoma multiforme (GBM) com comportamento muito invasivo, considerado a forma mais agressiva de todos os gliomas (Holland, 2000), esperava-se que sua taxa de proliferação fosse mais elevada que a taxa da linhagem A172, que não invade, conforme observado.

	Plástico	Colágeno	Matrigel
A172	37,65 ±	57,48 ±	44,45 ±
T98G	21,87 ±	32,0 ±	39,34 ±

Tabela 3: Tempos de dobramento para as linhagens do modelo utilizado nos diferentes substratos de cultivo. Valores de média de três experimentos ± desvio padrão.

Observou-se também neste ensaio que ambas as linhagens quando cultivadas sobre substrato, seja este gel de colágeno ou Matrigel™, apresentaram diminuição no crescimento em relação ao controle (plástico) (tabela 3 e figura 2).

Na figura 3 pode-se observar alterações morfológicas marcantes nas duas linhagens quando cultivadas sobre os substratos de matriz extracelular. A linhagem A172 apresentou prolongamentos de membrana alongados e maior bi-refringência quando cultivada sobre colágeno ou Matrigel (3 B-C); recuperando a morfologia semelhante às células da glia. Já a linhagem T98G apresentou-se menor e mais arredondada quando cultivada sobre colágeno e com citoplasma maior na condição de Matrigel, em relação ao plástico (controle) (3 E-F).

Figura 2: Curvas de crescimento das linhagens A172 e T98G, nos diferentes substratos, plástico, colágeno e Matrigel ao longo de 7 dias de cultivo. Observar as diferenças no padrão de crescimento das linhagens nos substratos, sendo mais lento nestes casos em relação ao controle (plástico).

Figura 3: Aspectos das culturas de A172 (A-C) e T98G (D-F) nos diferentes substratos, no terceiro dia de cultivo. A e D plástico (controle); B e E colágeno tipo1; C e F Matrigel. (Aumento 100X)

Notar a alteração da morfologia nos substratos de matriz. A linhagem A172 apresenta morfologia semelhante aos prolongamentos neurais (B e C), ficando ainda mais acentuada na presença de colágeno. A linhagem T98G também aparece bastante alterada na presença de substratos, sendo mais arredondada na presença de colágeno (E) e com citoplasma maior e com menos grânulos em Matrigel (F).

5.2 Cortes histológicos e microscopia eletrônica

Para vários autores a diferença que existe entre invasão e migração reside na natureza das barreiras que a célula precisa transpor para ir de um local para outro; em outras palavras, a invasão é definida como a migração através de uma matriz obstrutiva. Para vertebrados, um ensaio clássico para avaliar a invasão celular consiste em analisar o número de células dentro de géis de colágeno (Mareel & Leroy, 2003). Visando avaliar a capacidade invasiva das duas linhagens de glioma deste estudo, foram feitos cortes semi-finos de células cultivadas por 7 dias em gel de colágeno tipo 1.

De acordo com as imagens de microscopia óptica (Figuras 4 e 5), é possível observar que as células A172 estão aderidas à superfície do colágeno (Figura 4 - b e b'), enquanto as células T98G migraram para o interior do gel (Figura 5 - b até b''), ficando assim caracterizado o caráter invasivo desta última, já descrito por Nakagawa *et al*, 1996. Pode-se observar também uma divisão mitótica de T98G, representativa do franco padrão de proliferação destas células no interior do gel de colágeno.

A análise ultra-estrutural das células A172 e T98 cultivadas sobre gel de colágeno (Figuras 6 e 7) revelou que, vistas no microscópio eletrônico de transmissão, as células A172 (Figura 6) apresentam fenótipo distinto das células T98G (Figura 7).

Em relação ao parâmetro de análise que caracteriza o contato e interação da célula com o gel do colágeno, também podem ser observadas diferenças importantes. A linhagem A172 por ser pouco invasiva, apresenta uma superfície de contato com o colágeno muito lisa (Figuras 4 e 6), isto é, com pequenas projeções da membrana plasmática. Já a linhagem T98G apresenta grande quantidade de protrusões e invaginações desta membrana. Apresenta ainda, uma grande interação com o colágeno, à semelhança de adesões focais; detalhes destas interações entre membrana e fibrilas de colágeno podem ser observados (Figuras 5 e 7). Figuras semelhantes à de fagocitose de fibrilas de colágeno puderam ser observadas nestas linhagens (Figura 7c-c''), incluindo a interiorização de fibrilas para a degradação. Estas análises mostram que a linhagem T98G é mais invasiva, tem a capacidade de

interagir com a matriz extracelular e apresenta figuras convincentes de processo de heterofagia do colágeno, bem como a capacidade celular de contração deste substrato. Nas células T98G podem ser observadas invaginações com estrutura de um novo tipo de organela, podossomos. Os podossomos são estruturas dinâmicas envolvidas na degradação da matriz extracelular; contêm e secretam MMPs, sendo coerente encontrar estas organelas na linhagem capaz de invadir o substrato e a sua ausência na linhagem não invasiva.

Figura 4: Imagens da linhagem A172 após 7 dias de cultivo sobre gel hidratado de colágeno tipo 1, em cortes de 5 - 7 μm de espessura corados por azul de toluidina. As células ficam sobre o gel, sem migrar para dentro da matriz (a e a'); detalhes das bordas das células em contato com o gel, sem prolongamentos que lembrem adesões focais (b, c e d).

Figura 5: Imagens da linhagem T98G após 7 dias de cultivo sobre gel hidratado de colágeno tipo 1, em cortes de 5 - 7 μm de espessura corados por azul de toluidina. Na figura a o início do processo de

invasão; invasão estabelecida em **b-b''**; detalhe do contato entre as células em **c**; divisão mitótica ocorrendo no interior do gel de colágeno em **d**; detalhe da sobreposição de células em **e**.

Figura 6: Ultra-estrutura da célula A172 após 7 dias de cultivo sobre gel hidratado colágeno tipo 1, obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão. CO, gel de colágeno; RER, retículo endoplasmático rugoso; MV, microvacúolos; N, núcleo; Mi, mitocôndria.

Figura 7: Ultra-estrutura da célula T98G após 7 dias de cultivo sobre gel hidratado colágeno tipo 1, obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão. CO, gel de colágeno; RER, retículo endoplasmático rugoso; N, núcleo; *, heterofagia do colágeno. As setas indicam os prolongamentos da membrana plasmática e suas interações com o substrato.

5.3 Northern-blot e PCR em tempo real

Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes, para as duas linhagens de glioma, cultivadas nos três diferentes substratos. A linhagem STR9, que super-expressa o gene *RECK*, foi utilizada como controle positivo. Antes da reação de transcrição reversa, a qualidade dos RNAs extraídos foi analisada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído (figura 8). Através desta figura é possível observar que a maioria dos RNAs estão livres de contaminação por DNA genômico, que apareceria como um arraste na região superior à banda de 28S; que não há degradação dos RNAs, que seria evidenciado por um arraste inferior à banda 18S. Finalmente, observa-se que, a relação 28S/18S está adequada.

Figura 8: Gel de agarose-formaldeído dos RNAs obtidos para análise da qualidade dos RNAs.

A partir destes RNAs, previamente tratados com DNase I (Sigma), foi feita então a RT-PCR para produção dos cDNAs que serviriam de 'template' para a reação de PCR em tempo real. Tais cDNAs também tiveram sua qualidade testada através de três reações de PCR, com os primers para *GAPDH*, *NOTCH-1* e *MLH-1*. Estes controles têm as seguintes finalidades: todas as amostras devem gerar produtos para *GAPDH*, pois trata-se de um gene expresso constitutivamente; nenhuma amostra de cDNA deve gerar produto para *MLH-1*, porque estes primers estão na região intrônica do gene, apenas DNA genômico contaminante seria

amplificado neste caso. No caso de *NOTCH-1*, o que está sendo testado é a amplificação de genes longos. A transcrição reversa se inicia na cauda poli-A do mRNA, na extremidade 3'; para genes longos como é o caso de *NOTCH-1*, pode ocorrer a interrupção da transcrição antes que a transcriptase reversa chegue à extremidade 5'. Como os primers para *NOTCH-1* reconhecem a extremidade 5', os cDNAs que gerarem produtos foram totalmente transcritos. Confirmada então a qualidade dos cDNAs sintetizados, foi feita a análise da expressão gênica de *RECK*, *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-14* e *TIMP-2* por PCR em tempo real, tendo como controles internos os genes *GAPDH* e *Tubulina*.

Na figura 9, os valores de expressão relativa foram normalizados em função da expressão de *RECK* para a condição T98G cultivada em plástico por 3 dias. O perfil de expressão do gene alvo em relação aos dois controles utilizados é bastante semelhante, especialmente para o tempo de cultivo de 7 dias, e foi validado pelo ensaio de Northern blot. A expressão de *RECK* relativa ao gene de *tubulina* apresentou desvios padrão menores do que aqueles da expressão relativa à *GAPDH*. Observa-se que, de uma maneira geral, a expressão de *RECK* está aumentada no sétimo dia de cultivo em relação ao terceiro, tempo em que o processo de invasão está estabelecido.

Estes dados que mostram *RECK* com expressão aumentada no momento em que o processo invasivo é estabelecido são particularmente interessantes, uma vez que há vários estudos envolvendo *RECK*, descrevendo-o como pouco ou nada expresso em linhagens tumorais (Takahashi *et al*, 1998; Oh *et al*, 2001; Sasahara *et al*, 2002 e Welm *et al*, 2002). Por outro lado, os trabalhos que descrevem expressão do gene *RECK* em tumores, associam a expressão aumentada deste gene com melhores prognósticos.

O perfil do comportamento da linhagem A172 se mantém para os dois tempos de cultivo e para os dois controles internos, sendo que o substrato de colágeno aparece como importante indutor da expressão de *RECK* ($P < 0,001$). Para a linhagem T98G, tomando como controle interno o gene da *tubulina*, observa-se também que o perfil apresentado se repete para os dois tempos de cultivo; porém o substrato que induz a maior expressão de *RECK* neste caso é o Matrigel ($P < 0,001$).

O cultivo em colágeno também apresenta um valor da expressão de *RECK* com alteração relevante, quase duas vezes maior que o controle (plástico), mas a expressão induzida pelo Matrigel é ainda maior do que a induzida por colágeno ($P < 0,01$). As alterações induzidas por estes substratos de matriz em relação a *RECK* são indicativos de que este estudo possivelmente colaborará para a descrição de um novo quadro das funções deste gene perante o ambiente tridimensional gerado *in vitro*.

Os valores de expressão gênica foram submetidos à análise de variância pelo teste One-way ANOVA, e posterior comparação pelo teste de Tukey-Kramer, sendo considerados significativamente diferentes valores com $P \leq 0,05$. Apresentaram diferenças significantes as seguintes condições: A172 3 dias em relação a 7 dias para o substrato de colágeno ($P < 0,001$) e T98G 3 dias em relação a 7 dias para o substrato de Matrigel ($P < 0,001$), demonstrando que há aumento da expressão de *RECK* na linhagem menos invasiva e também no estabelecimento do processo invasivo; além de A172 em relação a T98G cultivadas em colágeno 7 dias ($P < 0,001$) evidenciando a modulação do gene na presença de substratos de matriz.

Como *RECK* atua regulando algumas metaloproteases de matriz (MMP-2, -9 e -14), analisamos a expressão destas enzimas e de um de seus inibidores endógenos (TIMP-2), a fim de estabelecer correlações entre os padrões de expressão destes genes no processo invasivo. No caso das MMPs e TIMP-2, só foram analisadas amostras do sétimo dia de cultivo, quando o processo invasivo está efetivamente estabelecido, momento no qual há uma maior participação destas enzimas. Estes experimentos foram feitos em duplicatas independentes.

Os resultados da expressão das metaloproteases e de seu inibidor natural são também muito interessantes. No caso das MMPs 2 e 9, fica bastante claro que as expressões destas duas enzimas são muito menores na linhagem A172 quando comparada à T98G ($P < 0,05$), sendo este dado consistente com o caráter não invasivo e invasivo, respectivamente. Também para TIMP-2 o resultado coincide com este caráter, sendo este inibidor endógeno das MMPs muito mais expresso na linhagem que não invade o substrato de colágeno (A172). Estes dados também são condizentes com os resultados de zimografia, que revelam os níveis de atividade

das MMPs, apresentados a seguir. No caso da MMP de membrana analisada, *MMP-14*, nenhuma tendência que diferencie as duas linhagens ficou evidente neste ensaio, apenas que para a linhagem A172 o substrato de colágeno parece induzir a sua expressão.

Na figura 11 estão os resultados do experimento de northern blot, realizado para validação dos dados de PCR em tempo real.

Figura 9: Gráficos da média da expressão relativa de *RECK* em relação a dois controles internos (*GAPDH* e *Tubulina*) analisada por PCR em tempo real. Média e desvio padrão relativos a três experimentos independentes. Observar a menor expressão de *RECK* na linhagem T98G, mais invasiva, quando comparada à A172. Aumento da expressão de *RECK* no processo invasivo que está estabelecido em 7 dias de cultivo e, quando as células estão em substrato de colágeno. Notar que apesar de os desvios serem maiores quando se usa *GAPDH* como controle interno, o perfil de expressão se mantém. Os valores foram normalizados por T98G 3 dias plástico.

Figura 10: Gráficos da média da expressão relativa de MMPs e TIMP-2 em relação ao controle *Tubulina* analisada por Real time PCR. Média e desvio padrão relativos a dois experimentos independentes. Notar que as MMPs 2 e 9 apresentam níveis de expressão muito mais altos em T98G do que em A172; ao contrário de TIMP-2, que está mais expressa na linhagem menos invasiva.

Figura 11: Expressão relativa do gene RECK analisada através do ensaio de Northern blot utilizando como controle interno o gene 36B4. Este ensaio foi utilizado como validação dos resultados de PCR em tempo real e mostra a influência do substrato de colágeno na expressão de RECK na linhagem A172.

5.4 Zimografia

Dois resultados muito interessantes foram revelados por este ensaio, relativos à diferença entre a atividade das MMP-2 e 9 (pesos moleculares 72 e 92 kDa, respectivamente). Primeiramente pode-se observar que a linhagem A172, de caráter não invasivo, apresenta níveis de atividade de MMP-2 muito menores do que a linhagem T98G, de caráter invasivo (Figuras 12 e 13).

Figura 12: Gel de zimografia dos meios de cultura coletados das diferentes condições de cultivo para detecção da atividade de MMPs.

Nos gráficos apresentados na figura 13, estão representadas as diferenças de atividade entre as duas linhagens para cada substrato, sendo estatisticamente significativas as diferenças entre os níveis de atividade de MMP-2 para as duas linhagens em todas as condições de cultivo ($P < 0,001$, para o substrato de matrigel, $P < 0,01$, para o cultivo em plástico e $P < 0,05$, para o cultivo em colágeno). No caso da atividade de MMP-9, que só pode ser visualizada no gel para a condição de cultivo em substrato de colágeno, não foram significativas as diferenças medidas para a atividade desta enzima entre as duas linhagens. Este resultado, da modulação do substrato de colágeno na atividade das MMPs 2 e 9, pode ser observado tanto para a linhagem A172 quanto para T98G (Figuras 14 e 15).

Igualmente interessante foi a descoberta da substancial diferença de atividade entre estas mesmas MMPs em função do substrato de cultivo celular, para cada uma das duas linhagens de glioma separadamente, sendo os níveis de MMP-2 bastante elevados para as células cultivadas em colágeno. A atividade de MMP-2 na linhagem T98G não apresenta diferença entre os níveis de atividade tão acentuada,

mas ainda assim no cultivo em colágeno há diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$).

O EDTA é utilizado como inibidor de MMPs por apresentar habilidade de quelar ou se complexar com íons metálicos, tornando os íons de zinco indisponíveis para as MMPs, que são dependentes deste íon (Okada *et al*, 1990). Por esta razão EDTA é utilizado como controle em ensaios de atividade enzimática de MMPs, a fim de confirmar a natureza das enzimas gelatinolíticas (Haas *et al*, 1998; Souza *et al*, 2001; Kato *et al*, 2002). Como observado na figura 16-B, as bandas correspondentes às MMPs 2 e 9 são inibidas por este quelante.

Outro inibidor da atividade de MMPs utilizado como controle em nossos ensaios é o Ilomastat (GM 6001). Esta molécula apresenta um amplo espectro de inibição para várias MMPs, sendo efetivo para as MMPs 1, 3 e 8, além das MMPs 2 e 9, de interesse neste estudo. O Ilomastat pertence a uma classe de inibidores sintéticos que apresenta um grupo hidroxamato onde se ligam íons metálicos, neste caso o íon de zinco (Overall, 2002; Ikeriji *et al*, 2005).

Figura 13: Comparação entre as atividades da metaloproteases MMP-2 e MMP-9 apresentadas pelas duas linhagens de glioma quando cultivadas nos três diferentes substratos. Valores absolutos, sem normalização. Notar que, para MMP-2, há diferença entre a atividade nas duas linhagens para todos os substratos.

Figura 14: Atividade das MMPs 2 e 9 para a linhagem A172 cultivada nos diferentes substratos: plástico (P- controle), colágeno (C) e matrigel (M). Valores normalizados pela atividade no substrato controle. ** = $P \leq 0,01$ e *** = $P \leq 0,001$.

Figura 15: Atividade das MMPs 2 e 9 para a linhagem T98G cultivada nos diferentes substratos: plástico (P- controle), colágeno (C) e matrigel (M). Valores normalizados pela atividade no substrato controle. ** = $P \leq 0,01$ e *** = $P \leq 0,001$.

Figura 16: Géis de zimografia com e sem inibidores de metaloproteases. A: sem inibidores; B: com EDTA 0,5 mM; C: com Ilomastat (GM6001) 0,5 mM.

6. Discussão

Gliomas malignos constituem o tipo de tumor primário mais comum e mais agressivo do sistema nervoso central em adultos. Estudos recentes focados nos mecanismos de invasão de gliomas sugerem que as MMPs desempenham um papel crítico neste processo. MMPs fazem parte de uma grande família de endopeptidases naturais dependentes de zinco, que promovem a invasão de células tumorais através da degradação das proteínas da matriz tais como colágeno, fibronectina e proteoglicanos (Coussens *et al*, 2002; Annabi *et al*, 2004). Tem sido amplamente discutido o papel sinalizador da estrutura da matriz extracelular na atividade de células normais e tumorais, sendo que a matriz insolúvel, composta na sua maior parte por colágenos, mostra-se capaz de atuar ativamente em eventos como formação, crescimento e homeostase (Ramirez & Rifkin, 2003; Schmeichel & Bissel, 2003).

Com base nestes relatos, cada vez mais consolidados, optamos por utilizar diferentes elementos de MEC, gel hidratado de colágeno tipo 1 e Matrigel, além do plástico para medir expressões gênicas e atividades protéicas das linhagens deste estudo, buscando fornecer condições biomiméticas, que reproduzam o mais fielmente possível, as condições encontradas *in vivo*.

Para as duas linhagens deste estudo foi verificada uma diminuição do proliferação celular na presença substratos de matriz extracelular comparado ao controle (plástico). Este retardo no crescimento celular em substrato de matriz extracelular pode ser explicado pela hipótese postulada por Giese *et al*, (1996) que descreve um comportamento do tipo “go versus grow” para astrocitomas, onde a divisão celular e a migração são eventos temporalmente exclusivos e, que as células tumorais adiam a proliferação privilegiando a migração.

Há estudos, incluindo a linhagem A172, que sugerem que as células de glioma são capazes de modular seu microambiente, alterando assim sua sobrevivência, migração e invasão e, que tais células são sensíveis às proteínas da matriz extracelular (Cordes *et al*, 2003). Tais relatos dão suporte às observações

feitas na proliferação das linhagens A172 e T98G nos substratos da MEC. Alterações morfológicas bastante acentuadas podem ser observadas na figura 3, demonstrando que a presença do substrato, em particular de colágeno tipo 1, promove uma recuperação do fenótipo das células neurais que deram origem às linhagens, onde podem ser visualizados neuritos.

O aumento da expressão do gene *RECK* (figura 9), foi observado na linhagem menos invasiva em relação à mais invasiva, confirmando os estudos publicados até o presente momento que descrevem *RECK* menos expresso em tumores *versus* tecido normal. Também observou-se que os resultados de expressão gênica parecem indicar um aumento da expressão de *RECK* quando o processo invasivo está estabelecido, aos 7 dias de cultivo.

Outro dado importante revelado aqui é o aumento da expressão de *RECK* no cultivo em substratos de matriz, mostrando a importância da modulação do ambiente biomimético e a perspectiva de seu uso como uma alternativa terapêutica. Nossos resultados sugerem que *RECK*, como um potente inibidor de MMP 2, 9 e MT1-MMP, esteja envolvido no processo invasivo no modelo de glioma, uma vez que este gene aparece pouco expresso pela linhagem invasiva T98G e muito expresso em A172. Além disso, a expressão de *RECK* está em relação inversa com os níveis de expressão de MMPs 2 e 9, que são fortemente expressos por T98G em comparação com A172, o que contribui para o comportamento agressivo das células T98G. Como a expressão e atividade das MMPs aparecem aumentadas em quase todos os tipos de câncer, nos processos de invasão e metástase, relacionadas com o estágio avançado do tumor (Egeblad & Werb, 2002), a diferença entre a atividade das MMPs entre as linhagens A172 e T98G era esperada para o cultivo em plástico.

O substrato de Matrigel promove a diferenciação de vários tipos celulares; algumas linhagens, bem como algumas culturas primárias não proliferam, mas se diferenciam quando expostas à esta matriz (Kleinman & Martin, 2005). O que pôde ser observado neste trabalho foi um decréscimo na proliferação das linhagens cultivadas em Matrigel, acompanhado de alterações morfológicas, embora não tão acentuadas quanto às observadas no cultivo em colágeno. No que diz respeito às expressões gênicas avaliadas, o substrato de Matrigel parece induzir a expressão de

RECK na linhagem T98G, porém sem atingir níveis de significância estatística. Também não foram registradas alterações nas atividades das MMPs 2 e 9 devido ao cultivo na presença deste substrato.

A análise das expressões gênicas das *MMPs* e de *TIMP-2* revelou que, apesar de estas *MMPs* não serem reguladas transcricionalmente por *RECK* (Oh *et al*, 2001), a linhagem de caráter mais invasivo já apresenta níveis mais altos de *MMPs* a partir de RNAs. Um dado interessante é que para A172 e T98G há um paralelismo entre os inibidores naturais *RECK* e *TIMP-2*, ou seja, a linhagem A172 que expressa maiores níveis de *RECK* também expressa maiores níveis de *TIMP-2*. Embora os padrões de expressão dos inibidores naturais de *MMPs*, *RECK* e *TIMP-2*, sejam semelhantes em função da invasividade das linhagens deste modelo de glioma, há um ponto de divergência que torna *RECK* um alvo mais interessante para terapias gênicas em comparação com *TIMP-2*: a expressão de *RECK* pode ser modulada pelo microambiente, neste caso pelo substrato de colágeno tipo 1, enquanto a expressão de *TIMP-2* não sofre influência dos substratos testados em nosso modelo.

Takahashi *et al* (1998) e Oh *et al* (2001) descreveram que não há inibição ao nível transcricional de *MMPs* por *RECK* no modelo de fibrossarcoma humano (células HT-1080), mas que *RECK* interage diretamente com *MMP 2* e *9* e com *MT1-MMP*, inibindo suas atividades; considerando estes dados analisamos as atividades de *MMP 2* e *9* através de zimografia. *MMP 2* apresenta grande atividade para células T98G, em contraste com as células A172. Os níveis de atividade de *MMP 2* e *9* são ainda maiores quando as células T98G migram para o interior do gel de colágeno; enquanto as células A172, que não invadem o substrato, apresentam baixos níveis de atividades destas *MMPs*.

Nossos resultados estão também de acordo com o que foi descrito por Wang *et al* (2003); eles analisaram a expressão de *MMP 2* e *9* através de imunohistoquímica e descobriram que tecido cerebral normal não apresenta reação positiva para *MMP 2* e *9*, mas nas amostras de gliomas, as taxas de marcação para estas *MMPs* estavam significativamente elevadas com o aumento do grau de malignidade.

Por outro lado, nossos dados demonstram algo que nunca foi relacionado antes ao gene supressor de tumor e metástase *RECK*: quando as duas linhagens de glioma, A172 e T98G, são cultivadas na presença de substrato de colágeno tipo I há um aumento da expressão de *RECK* acompanhado por um aumento na atividade das MMPs 2 e 9. Este fato é exatamente o oposto do que foi descrito para as células de fibrossarcoma HT-1080, em que altos níveis de expressão de *RECK* estão associados com baixos níveis de atividade das MMPs (Takahashi *et al*, 1998; Oh *et al*, 2001).

Colágeno tipo I é um componente da matriz extracelular conhecido por promover a ativação de MMP-2 em vários tipos celulares. A maneira como ocorre esta ativação de MMP-2 induzida por colágeno tridimensional tipo I ainda não foi esclarecida. Entretanto, evidências repetidas têm demonstrado que a expressão de MT1-MMP é essencial para ativação de MMP-2 para vários tipos celulares embebidos em matriz colagênica tridimensional (Guo & Piacentini, 2003). Foi documentado que para outras linhagens celulares, além das derivadas de gliomas, como fibrossarcoma humano e células hepáticas estreladas, que o cultivo em colágeno tipo 1 induz a atividade de MMP-2 e de MMP-14, envolvida no processo de ativação de MMP-2, segundo Takino *et al*, 2004 e Théret *et al*, 1999.

Como o ocorrido em nossos ensaios, já foi demonstrado que o cultivo em substrato tridimensional de colágeno tipo 1 promove a indução e ativação de MT1-MMP e de MMP-2 em células endoteliais de rato, porém na presença de Matrigel™ tridimensional o mesmo não foi observado (Haas *et al*, 1998). O ácido hialurônico (HA), um proteoglicano abundante na matriz do cérebro, é sintetizado e secretado por células de glioma; seu receptor primário, CD44, é uma glicoproteína de membrana funcionalmente regulada por MMP-14. Em estudo analisando a ligação do HA com linhagem derivada de glioma (U87) foi visto que o substrato de colágeno tipo 1 favorecia a ligação ao HA, levando à uma reorganização morfológica e à ativação da forma latente de MMP-2 (Annabi *et al*, 2004), como também foi verificado neste estudo. No presente estudo foi verificado, além das alterações morfológicas o aumento da atividade da MMP-2 no cultivo em colágeno tipo 1; segundo o estudo citado com linhagem U87, este aumento na atividade de

MMP-2 verificado é possivelmente proveniente de uma via dependente de MMP-14.

Ao trabalhar com a linhagem de fibrossarcoma humano HT1080, Takino *et al*, 2004 descrevem que a metaloprotease MMP-14, envolvida na via de ativação da MMP-2, participa de uma via de ativação de ERK induzida por colágeno. A via de ERK induz a expressão e os altos níveis de atividade de MT1-MMP que, por ter um papel essencial na ativação de MMP-2, leva a uma conseqüente ativação de MMP-2 mediada por colágeno. Munshi e colaboradores (2004) em trabalho realizado com células de carcinoma escamoso da cavidade oral (OSCC), cultivadas em matriz de colágeno tipo 1, analisam a interação entre MMPs e vias de MAPK, e descrevem, diferentemente de Takino *et al* (2004), que a via de ERK e a de p38MAPK não afetam a expressão de MT1-MMP e de MMP-2, embora a atividade destas metaloproteases seja regulada por estas duas vias, sensíveis à ação de TGF- β 1. Por outro lado, Haas *et al* (1998) não observaram efeito de TGF- β 1 nos níveis de MMP-2 ou MT1-MMP em estudo com células endoteliais de rato.

Baseado nos dados de Takino *et al* (2004) e Munshi *et al* (2004), analisamos o comportamento das linhagens de glioma em relação à atividade das MMPs, que quando cultivadas em substrato de colágeno apresentam aumento na atividade de MMP-2 e 9. Este aumento na atividade de MMP-2 pode ser resultante de estímulo do substrato de colágeno sobre MMP-14, como descrito para linhagens de fibrossarcoma e OSCC. Porém, a relação entre aumento da expressão de RECK e concomitante aumento da atividade das MMPs 2 e 9 permanece incógnita e divergente dos dados da literatura, onde o aumento de RECK é acompanhado pela diminuição das atividades destas metaloproteases (Oh *et al*, 2001).

O tratamento de células de glioma humano U-87 com colágeno tipo I induziu profundas alterações morfológicas e esta perturbação na morfologia celular foi acompanhada pela ativação de MMP-2 (Annabi *et al*, 2004), dado que também está de acordo com nossos resultados. Dados das células A172 mostram evidências de que o substrato de colágeno provocou um aumento significativo na expressão de MT1-MMP, acompanhado por aumento também da atividade de MMP-2. Ainda mais interessante, nós relatamos neste trabalho que, além da indução da expressão

de MT1-MMP há também uma indução na expressão de RECK, para as duas linhagens de glioma na condição de cultivo em colágeno.

Outro evento evidenciado pelo cultivo da linhagem invasiva T98G em colágeno é a presença de estruturas semelhantes a podossomos, uma organela recentemente descrita envolvida na degradação de MEC. Estas estruturas são tipicamente encontradas em células que precisam atravessar fronteiras teciduais (Linder & Aeppelbacher, 2003), tais como T98G invadindo a matriz de colágeno. Podossomos são arranjos colunares de filamentos de actina circundando invaginações tubulares estreitas da membrana plasmática, grosseiramente perpendicular ao substrato (Spinardi *et al*, 2004). Tem sido descrito que os podossomos contêm e secretam MMPs, o que é consistente com os níveis de expressão e atividade de MMPs que descrevemos para T98G.

Oh *et al* (2004) relataram que TIMP-2 é capaz de induzir a expressão de RECK em células endoteliais micro vasculares hMVECs. A família das TIMPs é composta por quatro inibidores naturais de MMPs, TIMPs 1-4. Decidimos avaliar TIMP-2 no modelo de glioma uma vez que esta molécula participa do complexo de ativação de MMP-2, que é regulado por RECK. Além disso, nossos dados mostram um aumento de atividade de MMP-2 quando as células são cultivadas em colágeno, para ambas as linhagens, A172 e T98G. TIMP-2 possui um receptor de superfície que media diretamente a inibição do crescimento celular, diferentemente das outras TIMPs.

A ausência de RECK é letal em embriões de camundongo, enquanto a ausência de TIMPs 1 e 2 afeta muito pouco o desenvolvimento embrionário, o que foi sugerido por Oh *et al* (2001) é que RECK apresenta pouca redundância funcional com TIMPs, pelo menos até o décimo dia de desenvolvimento embrionário. Embora nossos resultados sejam de linhagens de gliomas humanos, em nosso modelo RECK e TIMP-2 apresentam padrões semelhantes entre si, tais como níveis de expressão e regulação de MMPs.

Concluindo, estes padrões de expressões gênicas parecem estar em efeito gangorra: enquanto MMPs 2 e 9 apresentam altos níveis, seus inibidores, RECK e TIMP-2 apresentam níveis baixos, o que é consistente com os caracteres invasivo e

não-invasivo descritos para T98G e A172 respectivamente. Tomando os resultados em conjunto, uma hipótese que pode ser aventada é um mecanismo de feedback positivo entre a expressão de *RECK* e as atividades de MMPs 2 e 9, sob influência de colágeno, a fim de conter a progressão tumoral. Desde que *RECK* foi descrito inicialmente, este balanço inverso entre as expressões de *RECK* e *MMPs* está sendo relacionado com aumento na sobrevida de pacientes para vários tipos tumorais, tais como hepatocarcinomas, câncer de mama, câncer cólon retal, de próstata e tumores pancreáticos (Furomoto *et al*, 2001; Masui *et al*, 2003; Span *et al*, 2003; Takeuchi *et al*, 2004; Takenaka *et al*, 2004).

A elucidação da expressão de *RECK* e sua relação com as MMPs em diferentes níveis, expressão gênica e atividade de MMPs 2 e 9 e de MT1-MMP podem contribuir para a compreensão do processo de invasão e metástase em gliomas. Devido à complexidade das vias de sinalização envolvendo as MMPs, se *RECK* é realmente um de seus reguladores efetivos no modelo de glioma ainda é uma questão não respondida.

Esta correlação positiva foi recentemente estudada por Oh *et al* (2004), onde ficou demonstrado que *TIMP-2* induz a expressão de *RECK* em células endoteliais microvasculares humanas (hMVECs).

Takahashi *et al*, 1998, atribuiu ao gene *RECK* e a seu produto protéico uma regulação negativa da atividade das MMPs, especificamente as MMPs 2 e 9. Os ensaios aqui descritos revelaram que as linhagens de glioma A172 e T98G cultivadas em gel de colágeno além de apresentarem a expressão gênica de *RECK* aumentada, também apresentam maior atividade das metaloproteases neste substrato (figura 11); diferindo do que foi descrito até o presente momento para este gene, que atua contendo a atividade destas duas enzimas.

Assim formulamos as seguintes hipóteses com base em nossos dados: 1) *RECK* e as MMPs podem estar envolvidos numa via de feedback positivo, sendo que quando a atividade das MMPs está aumentada a expressão de *RECK* é estimulada para conter a atividade das enzimas; 2) sugere-se que existam vias de regulação da atividade das MMPs que sejam independentes de *RECK*.

As metaloproteases MMP-14 e, consequentemente MMP-2, são reguladas de modo diferentes pela via de ERK e pela via de p38MAPK, sendo que a inibição de ERK 1/2 promove a proteólise pericelular induzida por TGF- β 1, enquanto a inibição da via de p38MAPK leva à inibição da proteólise. Estes dados indicam uma dificuldade para a prática de terapias antitumorais que combinem agentes sinalizadores das vias de TGF- β 1 com inibidores específicos de MPAK para regular a degradação de colágeno e invasão tumoral (Munshi *et al*, 2004).

Estas dificuldades apresentadas para o uso de inibidores das vias que regulam MMPs, bem como com os inibidores sintéticos das MMPs, reforçam ainda mais a importância de pesquisas alternativas para a regulação negativa da atividade das MMPs via inibidores naturais, como é o caso de RECK, que se mostra um potencial alvo de terapia para contenção de invasão e metástase.

7. Conclusões

Segundo a caracterização das duas linhagens deste trabalho, ficou demonstrado que a linhagem T98G apresenta comportamento invasivo, quando cultivada em substrato de matriz tridimensional; este mesmo comportamento não foi verificado para linhagem A172.

Segundo as curvas de crescimento realizadas para estas linhagens, nota-se que a linhagem T98G tem um crescimento mais rápido, quando comparada à A172. Além disso, as duas linhagens apresentaram um retardo no crescimento na presença de elementos de matriz extracelular, como colágeno tipo 1 e Matrigel.

A análise da expressão de *RECK* revelou que este gene é mais expresso pela linhagem menos invasiva, A172, em relação à T98G. Também ficou evidente que *RECK* aparecia mais expresso no tempo de 7 dias, quando o processo invasivo está estabelecido, em comparação com sua expressão no tempo de 3 dias de cultivo. Por último, foi detectado um aumento da expressão deste gene para o cultivo em substrato de colágeno, para a linhagem A172.

Ao contrário do que foi verificado para o gene *RECK*, os genes das *MMPs* 2 e 9 aparecem menos expressos em A172, em comparação com T98G. Já *TIMP-2*, um inibidor endógeno como *RECK*, também apresenta maior expressão em A172, em comparação à T98G.

As atividades das *MMPs* 2 e 9, verificada por zimografia, aparecem em níveis bem mais elevados para a linhagem T98G, em relação aos níveis detectados para A172. Para estas duas linhagens o substrato de colágeno gera aumento substancial na atividade destas duas *MMPs*.

9. Referências bibliográficas

- Akbasak, A. & Sunar-Akbasak, B. *Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumours*. **J. Neurol. Sci.** 111(2): 119-133,1992.
- Annabi B, Thibeault S, Moumdjian R, Beliveau R. *Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells*. **J Biol Chem.** 2004 May 21;279(21):21888-96.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities*. **J Cell Sci.** 2002 Oct 1;115:3719-27.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. *Primary brain tumours in adults*. **Lancet.** 2003 Jan 25;361(9354):323-31. Review
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Neto, A.G.F., 1976. *Manual de práticas para histologia normal e patológica*. Edart-Edusp, São Paulo, p. 239.
- Benaud, C.; Dickson, R.B. & Thompson, E.W. - *Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer*. **Breast Cancer Res Treat**, 50(2): 97-116., 1998.
- Bernardo MM & Fridman R. *TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP*. **Biochem J.** 2003 Sep 15; 374 (Pt 3):739-45.
- Bissell MJ & Labarge MA. *Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?* **Cancer Cell.** 2005 Jan;7(1):17-23. Review.
- Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. *The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast*. **Differentiation.** 2002; 70(9-10):537-46.
- Chang C, Werb Z. *The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis*. **Trends Cell Biol.** 2001 Nov; 11(11):S37-43. Review.

- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*. **Biochemistry**. 1979 Nov 27;18(24):5294-9.
- Chung AS, Yoon SO, Park SJ, Yun CH *Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis*. **J Biochem Mol Biol**;36(1):128-37, 2003.
- Cordes N, Hansmeier B, Beinke C, Meineke V, van Beuningen D. *Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines*. **Br J Cancer**. 2003 Dec 1;89(11):2122-32.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. **Science**. 2002 Mar 29;295(5564):2387-92. Review.
- Damsky, C. *Cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion receptors* **Ann.N.Y. Acad. Sci.**:154-155, 2002.
- DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. *Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section*. **Am J Pathol**. 2004 Apr;164(4):1131-9. Review.
- Demuth T, Berens ME. *Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion*. **J Neurooncol**. 2004 Nov;70(2):217-28. Review.
- Egeblad M, Werb Z. *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. **Nat Rev Cancer**. 2002 Mar;2(3):161-74. Review.
- Evdokiou, A. & Cowled, P.A. - *Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS1, in NIH3T3 fibroblasts*. **Exp Cell Res**, **240(2)**: 359-67., 1998.
- Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, Albini A. *Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities*. **Clin Exp Metastasis**. 2000;18(2):111-20. Review.
- Furumoto K, Arii S, Mori A, Furuyama H, Gorrin Rivas MJ, Nakao T, Isobe N, Murata T, Takahashi C, Noda M, Imamura M. *RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs*. **Hepatology**.;33(1):189-95, 2001.

- Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME. *Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation*. **Int J Cancer**. 1996 Jul 17;67(2):275-82.
- Guo C & Piacentini L. *Type I collagen-induced MMP-2 activation coincides with up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and TIMP-2 in cardiac fibroblasts*. **J Biol Chem**. 2003 Nov 21;278(47):46699-708.
- Haas TL, Davis SJ, Madri JA. *Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells*. **J Biol Chem**. 1998 Feb 6;273(6):3604-10.
- Holland EC. *Glioblastoma multiforme: the terminator*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000 Jun 6;97(12):6242-4.
- Ikejiri M, Bernardo MM, Bonfil RD, Toth M, Chang M, Fridman R, Mobashery S. *Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases*. **J Biol Chem**. 2005 Jul 26.
- Ingber, D.E. & Folkman, J. *Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix* **J Cell Biol** 109: 317-330, 1989.
- Itoh, Y. & Nagase, H. - *Matrix metalloproteinases in cancer*. **Essays Biochem**, 38(21-36, 2002.
- Juliano, R.L. & Haskill, S. *Signal transduction from the extracellular matrix*. **J Cell Biol** 120: 577-585, 1993.
- Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M. *Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells*. **Oncol Rep**. 2002 May-Jun;9(3):565-9.
- Kleinman HK & Martin GR. *Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity*. **Semin Cancer Biol**. 2005 Jun 20.
- Lin,C.Q. & Bissel M.J. *Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix*. **FASEB J**. 1993 Jun; 7 (9): 735-6.
- Linder S, Aepfelbacher M. *Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells*. **Trends Cell Biol**. 2003 Jul;13(7):376-85. Review.

- Liotta, L.A. & Kohn E.C. *The microenvironment of the tumour-host interface*. **Nature** 411(6835): 375-9, 2001
- Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. *Induction of RECK by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in lung cancer cells*. **Oncogene**. 2002 Nov 28;21(54):8347-50.
- Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J Biol Chem**. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Maher, E. A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavanee, W.K. & Depinho, R.A. *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. **Genes Dev**. 15(11): 1311-1333, 2001.
- Mareel M, Leroy A. *Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion*. **Physiol Rev**. 2003 Apr;83(2):337-76. Review.
- 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** 33 (10), 748-750, 1996.
- Martin, K.H., Slack, J.K., Boerner, S.A., Martin, C.C. Parsons, J.T. *Integrin connections map: to infinity and beyond* **Science** 296: 1652-1653, 2002.
- Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, Wada M, Noda M, Imamura M. *RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis*. **Clin Cancer Res**. 2003 May;9(5):1779-84.
- Munshi HG, Wu YI, Mukhopadhyay S, Ottaviano AJ, Sassano A, Koblinski JE, Plataniias LC, Stack MS. *Differential regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase activity by ERK 1/2- and p38 MAPK-modulated tissue inhibitor of metalloproteinases 2 expression controls transforming growth factor-beta1-induced pericellular collagenolysis*. **J Biol Chem**. 2004 Sep 10;279(37):39042-50.
- Mysliwiec, A.G. & Ornstein, D.L. - *Matrix metalloproteinases in colorectal cancer*. **Clin Colorectal Cancer**, 1(4): 208-19., 2002.
- 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** 28: 13-24,1996.

- Noda M, Junseo Oh, Rei Takahashi, Shunya Kondo, Hitoshi Kitayama and Chiaki Takahashi *RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling* **Cancer and Metastasis Reviews** 22: 167-175, 2003.
- Noel, A. & Foidart, J.M. - *The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo.* **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 3(2): 215-25., 1998.
- Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. *The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis* **Cell** 107(6): 789-800, 2001.
- Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M, Stetler-Stevenson WG. *Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK.* **Cancer Res.** 2004 Dec 15;64(24):9062-9.
- Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, Salvesen G, Nagase H. *Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties.* **Eur J Biochem.** 1990 Dec 27;194(3):721-30.
- Osborne RH, Houben MP, Tijssen CC, Coebergh JW, van Duijn CM. *The genetic epidemiology of glioma.* **Neurology.** 2001 Nov 27;57(10):1751-5.
- Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, Salvesen G, Nagase H *Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties.* **Eur J Biochem.** 1990 Dec 27;194(3):721-30
- Overall CM, Lopez-Otin C. *Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era.* **Nat Rev Cancer.** 2002 Sep;2(9):657-72. Review.

- Pupa, S. M.; Ménard, S., Forti, S. & Tagliabue, E. *New insights into role of extracellular matrix during tumor onset and progression* **J Cell Phys**192: 259-267, 2002.
- Ramirez F, Rifkin DB. *Cell signaling events: a view from the matrix.* **Matrix Biol.** 2003 Apr;22(2):101-7. Review
- Rao JS. *Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases.* **Nat Rev Cancer.** 2003 Jul;3(7):489-501. Review.
- Rasmussen HS, McCann PP. *Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat.* **Pharmacol Ther.** 1997;75(1):69-75. Review.
- Rhee, J.S. & Coussens, L.M. - *RECKing MMP function: implications for cancer development.* **Trends Cell Biol**, **12(5)**: 209-11., 2002.
- Romanic, A.M. and Madri, J.A. *Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system.* **Brain Pathol.** 4(2):145-56, 1994.
- Rooprai HK, Van Meter T, Rucklidge GJ, Hudson L, Everall IP, Pilkington GJ. *Comparative analysis of matrix metalloproteinases by immunocytochemistry, immunohistochemistry and zymography in human primary brain tumours.* **Int J Oncol.** 1998 Dec;13(6):1153-7.
- Roskelley, C.D. & Bissell, M.J. - *The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer.* **Semin Cancer Biol**, **12(2)**: 97-104, 2002. Review.
- Sanes, J. R. *Extracellular matrix molecules that influence neural development.* **Annu Rev Neurosci.**;12:491-516,1989.
- Sasahara, S.M. Brochado, C. Takahashi, Oh J., S.S. Maria-Engler, J. M. Granjeiro, M. Noda & M.C. Sogayar. *Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene.* **R.M. Cancer Detection and Prevention**, 2002.
- Schmeichel KL, Bissell MJ. *Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions.* **J Cell Sci.** 2003 Jun 15;116(Pt 12):2377-88. Review.
- Schor SL. *Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro.* **J Cell Sci.** 1980 Feb;41:159-75.

- Shannon RP, Sayre JW, Sayre JJ. *Patterns of care for adults with malignant glioma. JAMA*. 2005 May 25;293(20):2469-70.
- Shiomi T & Okada Y. *MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. Cancer Metastasis Rev*. 2003 Jun-Sep;22(2-3):145-52. Review.
- Singer, C.F.; Kronsteiner, N.; Marton, E.; Kubista, M.; Cullen, K.J.; Hirtenlehner, K.; Seifert, M. & Kubista, E. - *MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. Breast Cancer Res Treat*, **72(1)**: 69-77., 2002.
- Souza AP, Gerlach RF, Line SR. *Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. Biomaterials*. 2001 Jul;22(14):2025-30.
- Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D, Lindberg RL. *Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. Cancer*. 2003 Jun 1;97(11):2710-5.
- Spinardi L, Rietdorf J, Nitsch L, Bono M, Tacchetti C, Way M, Marchisio PC. *A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. Exp Cell Res*. 2004 May 1;295(2):360-74.
- 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*, **95(22)**: 13221-6., 1998.
- Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M, Wada H, Tanaka F. *Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. Eur J Cancer*. 2004 Jul;40(10):1617-23.
- 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*. 2004 Aug 15;10(16):5572-9.

- Takino T, Miyamori H, Watanabe Y, Yoshioka K, Seiki M, Sato H. *Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration.* **Cancer Res.** 2004 Feb 1;64(3):1044-9.
- Theret N, Lehti K, Musso O, Clement B. *MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells.* **Hepatology.** 1999 Aug;30(2):462-8.
- Vaday, G.G. & Lider, O. *Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation.* **J Leukoc Biol.** 2000 67(2):149-59. 2000.
- Wang F, Hansen RK, Radisky D, Yoneda T, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Turley EA, Bissell MJ. *Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts.* **J Natl Cancer Inst.** 2;94(19):1494-503, 2002.
- Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. *The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades.* **Brain Tumor Pathol.** 2003;20(2):65-72.
- Weinberg, R.A. - *Tumor suppressor genes.* **Science**, **254(5035)**: 1138-46., 1991.
- Welm B, Mott J, Werb Z. *Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK.* **Curr Biol.** 2002 Mar 19;12(6):R209-11. Review.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. *General mechanisms of metastasis.* **Cancer.** 1997 Oct 15;80(8 Suppl):1529-37. Review.