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

Efeito do 4-nerolidilcatecol na citotoxicidade e
inibição de invasão nas linhagens de glioma humano A172 e T98G

Renato Ramos Massaro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Silvyia Stuchi Maria-Engler

São Paulo
2009

Renato Ramos Massaro

Efeito do 4-nerolidilcatecol na citotoxicidade e
inibição de invasão nas linhagens de glioma humano A172 e T98G

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais
Sérgio Massaro e Sônia Maria Ramos Massaro
pelo apoio e amor incondicionais.

*"Calvin: It's a magical world Hobbes ol' buddy...
...let's go exploring!"*

Bill Watterson

Agradecimentos

Por onde começar? Muita gente contribuiu para esse trabalho, algumas de forma indireta e outras de forma mais específica. Acho que todos que passaram pela minha vida e fizeram parte dessa jornada contribuíram de alguma forma para que eu chegasse aqui, e com certeza todas essas pessoas mereciam ser agradecidas. Sem cada uma dessas pessoas que cruzaram meu caminho eu não seria quem sou hoje, e esse trabalho não seria possível. A todos vocês sou muito grato.

À minha orientadora Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler por conduzir o meu trabalho com competência e muita paciência, mesmo estando em outro país por uma parte do desenvolvimento do meu mestrado. Pelas discussões, toda a atenção dada, dedicação, por me dar liberdade de ser “cabeça-dura” em alguns momentos, e principalmente por acreditar na minha capacidade de desenvolvê-lo.

À Profa. Silvia Berlanga de Moraes Barros por acreditar no meu trabalho permitindo que eu entrasse grupo da *Pothomorphe umbellata*. Por todo o suporte e ajuda enquanto a Silvy estava no exterior, que continuou dando mesmo depois de sua volta. Todas as discussões e uma visão diferencial sobre o meu projeto que me ajudaram muito durante o desenvolvimento deste.

Às Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, Profa. Dra. Tania Marcourakis, Profa. Dra. Patricia Gama e Dra. Sueli Meiko Oba Shinjo por comporem minha banca de qualificação do mestrado e fazerem leitura crítica e contribuírem com meu trabalho.

À minha banca de defesa do mestrado por lerem minha dissertação e fazerem comentários que ajudaram na elaboração de sua versão final.

Aos meus companheiros de laboratório durante estes quase 5 anos que estou aqui. Alguns ficaram por pouco tempo, outros me acompanham até hoje: Cristina Ropke, Tania Sawada, Vanessa Vitoriano, Daniela Dayrell, Fabriciano Pinheiro, Diogo Rivelli, Rebeca Almeida, Mariana Moura, Juliana Sellis, Tatiana Corrêa, Laura Cardeal, Carla Brohem, Rafael Paes, Manoela dos Santos, Erika Matheus e Kaio Vitzel por toda a ajuda que me deram durante este período e pela convivência divertida a cada dia de trabalho.

Às técnicas Clarissa Kera, Silene Migliorini e principalmente à Camila Marinho pela prestatividade e eficiência. Sem elas desenvolver algo no laboratório demoraria dez vezes mais.

À Tatiana C. S. Corrêa por me agüentar durante a minha iniciação científica, por ter tanta paciência comigo no começo (e até hoje), por me ensinar quase tudo o que eu sei fazer no laboratório, pelas inúmeras conversas, lições de vida, palavras de incentivo e amizade. Sem sua ajuda eu não seria capaz de fazer o que eu fiz.

À Laura Cardeal por ter me ensinado também muitas coisas, inclusive a ser mais paciente e tolerante. Pelas discussões sobre experimentos, amizade, e por me ajudar a fazer os experimentos com muito mais calma e tranquilidade.

À Carla Brohem pela análise crítica em quase todos os experimentos, pela amizade incalculável, pela paciência com minhas brincadeiras, pelas broncas e brigas. Sua amizade e sua presença ao meu lado me fizeram crescer mais do que como cientista, mas também como pessoa.

Aos queridos amigos Diogo Rivelli e Rebeca Almeida, que não são só amigos, mas também isolam o 4-NC sempre com muito bom humor. Estão sempre à disposição para esclarecer dúvidas e ajudar no que é preciso.

Aos meus pais por toda a paciência, amor e apoio. Graças a eles eu tive todas as condições para fazer mestrado e tive a liberdade de escolher fazer algo que eu amo. Se não fosse pelo ambiente de carinho e aconchego que eles me proporcionam, pelo incentivo dado e pelo amor que tenho por eles, eu não chegaria nem na metade do caminho. Aos meus irmãos Eduardo e Ricardo por servirem de exemplo e serem meus heróis durante toda minha infância, e em conjunto com meus pais, pela companhia, momentos de descontração, conversas e incentivo durante toda a minha vida. À Luzia Cassiano, que cuida de mim e ajuda minha mãe a me mimar desde que eu tenho dois anos de idade.

Aos meus amigos cientistas: Brites, A. D.; Brohem, C. A.; Miguel, D. C.; Ferreira, G. B.; Mello, J. C. M., Vieira, M. L. e Takiishi, T., por todo o apoio e incentivo durante minha pós-graduação, por todas as discussões acerca de ciência, biologia, nossos trabalhos, bem como compartilhar comigo dificuldades e estresses pelos quais passaram durante a pós-graduação, mostrando que eu não estou sozinho neste barco. Aos meus grandes amigos Alice, Carla, Danilo, Gabriela, Joana, Mônica e Tatiana por fazerem o meu mestrado mais divertido e animado, pelas cervejas compartilhadas e momentos de descontração, pelas risadas dadas e por me ajudarem superar todas as vicissitudes durante esse período.

Aos professores Dra. Mari Cleide Sogayar (IQ-USP), Dr. Fernando Salvador Moreno (FCF-USP), Maria Julia Manso Alves (IQ-USP), Patricia Gama (ICB-USP), Claudimara Lotfi (ICB-USP), Telma Maria Tenório Zorn (ICB-USP), Rui Curi (ICB-USP) e Alison Colquhoun (ICB-USP) e todos os professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP por nos disponibilizarem seus laboratórios para alguns experimentos, e aos seus alunos pela disposição em nos ajudar.

Aos meus amigos Álvaro Miyazawa, Isaías Miranda e Adam McCarthy pela amizade e por me mandarem artigos em momentos de desespero e pressa. Aos amigos João Barão Neto, Júlia Pereira Chavez e Marina Pereira Chavez pela amizade incondicional e apoio mesmo estando fisicamente distantes.

Às secretárias do departamento, Ana, Edna, Dora e Suely. Aos Jorge e Elaine da sessão de pós graduação. À Carmen, Dorley, Rose e Cláudia. A todos os funcionários da FCF-USP. O trabalho de todos vocês foram essenciais para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho.

A toda minha família, por todo o carinho e apoio que me deram, principalmente aos meus tios Policício e Heliana e ao meu primo Daniel. À minha madrinha Beth Zink e ao meu padrinho Carlos Alberto Zink por todo o incentivo e por sempre torcerem por mim.

Ao CNPq, FAPESP, CAPES e PRP-USP pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MA – 3-metiladenina

4-NC – 4-nerolidilcatecol

5-FU – 5-fluorouracil

ADAM/ADAMTS – proteases (A Disintegrin And Metalloprotease)

Akt – proteínas também conhecidas como proteínas kinases B (PKB)

Bcl-2 – proteína anti-apoptótica ligada à membrana mitocondrial

Beclin-1 – APG6, proteína relacionada à autofagia (**AutoPhaGy**)

c-myc – oncogene. Codifica proteína que se liga ao DNA

CD44 – glicoproteína de membrana envolvida em interações célula-célula

CDK – Kinase dependente de ciclina

DME – Dulbecco's modified eagle's médium

FAK – Kinase de adesão focal

GBM – Glioblastoma Multiforme

IC – concentração inibitória

JNK – kinase da região NH2 terminal de cJun

LC3 – Proteínas associadas aos microtubules de cadeia leve 3 (Light Chain 3)

LPC – pifosfatidilcolina

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metaloproteinase de Matriz

MT-MMP – Metaloproteinase de Matriz de Membrana

mTOR – alvo da rapamicina em mamíferos

p21 – regulador de transição do ciclo celular

p53 – supressor de tumor. Proteína que participa em diversas vias de sinalização como ciclo celular.

PI3K – fosfatidilinositol-3-kinase

PTEN – homologo de fosfatase e tensina

PUMA – modulador de apoptose induzido por p53

RECK - *reversion*-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs. Regula algumas MMPs

Rho GTPase – subfamília da superfamília de Ras. Pode participar da polimerização e despolimerização da actina

SNC – Sistema Nervoso Central

TBT – tri-n-butyltin

TIMP – Inibidor Tecidual de Metaloproteinase de Matriz

TMZ – temozolomide

UVB – Radiação Ultra Violeta B

SFB – soro fetal bovino

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Concentrações utilizadas de 4-NC em µg/mL e suas concentrações correspondentes em µM	29
Tabela 2: Curva padrão de 4-nerolidilcatecol	42
Tabela 3: Porcentagem de 4-NC presente nas amostras de extrato liofilizado utilizadas no ensaio de citotoxicidade.	43
Tabela 4: Modulação da expressão e atividade das MMPs e seus reguladores analisados nos diversos níveis nas linhagens de glioma humano A172 e T98G tratadas com 4-NC.	61
Figura 1: Citotoxicidade do extrato de <i>P. umbellata</i> nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 2% de SFB.	38
Figura 2: Citotoxicidade do extrato de <i>P. umbellata</i> nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB.	38
Figura 3: Células de glioma cultivadas por 24h com extrato de <i>P. umbellata</i> a 10% de SBF (porcentagem de células vivas no canto direito inferior)	40
Figura 4: A - Curva de calibração de 4-NC. Pelo cálculo da regressão linear dos dados da tabela 1, foi obtida a equação da reta ($y=10494x - 3430,6$) e $R^2= 0,9992$. B – Estrutura química do 4-Nerolidilcatecol.	42
Figura 5: Número de células vivas em relação ao controle onde se observa a citotoxicidade do 4-NC nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB.	43
Figura 6: Células de glioma tratadas por 24h com 4-Nerolidilcatecol a 10% de SBF. (porcentagem de células vivas à direita inferior)	44
Figura 7: Contagem total das células das linhagens A172 e T98G tratadas com 4-NC nas concentrações apontadas por 24h e 48h. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)	45
Figura 8: Células vivas em relação ao controle investigado por incorporação de PI. Observa-se o número de células com integridade de membrana nas linhagens de glioma humano A172 e T98G na presença de 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC.	46

Figura 9: Fragmentação do DNA nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC. Notar o aumento da contagem em M1, principalmente nas concentrações de 13 µg/mL 15 µg/mL	48
Figura 10: Fragmentação do DNA nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC	48
Figura 11: Análise das fases do ciclo celular nas linhagens de glioma humano (A) A172 e (B) T98G a 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC	49
Figura 12: Expressão gênica relativa de A) MMP-2 B) MMP-9 C) MMP-14 D) RECK E) TIMP-2 nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)	51
Figura 13: Western Blotting das linhagens celulares A172 e T98G cultivadas com as concentrações de 4-NC apontadas.	53
Figura 14: Expressão protéica relativa de MMP-2 Ativa (A,C) e em sua forma pró-enzimática (B,D) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A e B – Expressão em relação à linhagem A172 sem tratamento. C e D – Expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na expressão protéica.	54
Figura 15: Expressão protéica relativa de MMP-14 em sua pró forma de 60 KDa (A,C) e em sua forma clivada de 42KDa (B,D) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A e B – Expressão em relação à linhagem A172 sem tratamento. C e D – Expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na expressão protéica.	55
Figura 16: Expressão protéica relativa de MMP-9 nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A – Expressão em relação à linhagem A172 sem tratamento. B – Expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na expressão protéica.	56
Figura 17: Zimograma das linhagens celulares A172 e T98G cultivadas com as concentrações de 4-NC apontadas	57
Figura 18: Atividade protéica relativa de MMP-9 em sua pró forma (A,C) e em sua forma ativa (B,D) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC	58

apontadas. A e B – Atividade em relação ao controle (DME + 10% SBF). C e D – Atividade em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na atividade enzimática	
Figura 19: Atividade protéica relativa de MMP-2 em sua pró forma (A, B), em sua forma intermediária (C, D) e em sua forma ativa (E, F) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A, C e E – Atividade em relação ao controle (DME + 10% SBF). B, D e F – Atividade em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na atividade enzimática	59
Figura 20: Invasão em câmara de Boyden (Transwell) sob microscopia de luz em aumento de 20x. Células coradas são as que atravessaram o Matrigel® e a membrana até a região externa da câmara.	62
Figura 21: Quantificação da invasão em câmara de Boyden (Transwell). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.	63
Figura 22: Western Blotting das linhagens A172 e T98G cultivadas com as concentrações de 4-NC apontadas mostrando a proteína LC3 em suas isoformas I e II.	64
Figura 23: Expressão protéica relativa de LC3 em sua forma não lipídica LC3-I (A e B) e em sua forma lipídica LC3-II (C e D). A e C – expressão em relação à linhagem A172 não tratada. B e D – expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)	65
Figura 24: Expressão gênica de (A) ATG-7 e (B) Beclin-1 nas linhagens de glioma A172 e T98G tratadas com 4-NC nas concentrações indicadas.	66
Figura 25: Citotoxicidade do 4-NC (13 $\mu\text{g/mL}$), 3-MA (2 mg/mL) e da mistura 4-NC (13 $\mu\text{g/mL}$) + 3-MA (2 mg/mL) incubados por (A) 24h e (B) 48h nas linhagens de glioma humano A172 e T98G.	67

Aluno: Renato Ramos Massaro

Orientadora: Silvyta Stuchi Maria-Engler

Nível: Mestrado

Título: Efeito do 4-nerolidilcatecol na citotoxicidade e inibição de invasão nas linhagens de glioma humano A172 e T98G

Volume: I **Número de páginas:** 158

RESUMO

Os gliomas apresentam comportamento amplamente infiltrativo e a invasão para o tecido cerebral sadio adjacente ao tumor o tornam um grande desafio para intervenções clínicas agressivas. Estudos recentes dos mecanismos de invasão de gliomas sugerem que as metaloproteinases (MMPs) desempenham papel crítico neste processo. As MMPs são super-expressas em quase todos os tumores humanos e vastos dados pré-clínicos as apontam como contribuintes do desenvolvimento maligno; portanto, a inibição de atividade de MMPs poderia ser adotada como uma estratégia de terapêutica anti-câncer. A atividade inibitória de MMP-2 e MMP-9 do extrato liofilizado da raiz de *P. umbellata* foi avaliada em estudos prévios de nosso laboratório por Ropke e colaboradores. Assim, esta dissertação teve como objetivo, primeiramente, explorar a citotoxicidade do extrato de *P. umbellata* e posteriormente, a avaliar o efeito do 4-nerolidilcatecol (o princípio ativo isolado do extrato) quanto à citotoxicidade e potencial de inibição de MMPs durante o processo de invasão de duas linhagens de glioma humano, caracterizadas pelos diferentes níveis de invasividade. Os resultados revelam os índices de citotoxicidade do extrato bruto da raiz de *P. umbellata* e do composto 4-NC presente nesse extrato. Ensaio de invasão tumoral *in vitro* em concentrações não citotóxicas mostraram que há forte inibição desse processo pelo composto. Interessantemente, o 4-NC não alterou significativamente a atividade e expressões gênicas e protéicas de MMPs envolvidas na invasão deste tipo de tumor, nem de seus reguladores. O ensaio de fragmentação do DNA nos indica que a morte das células é, em parte, devido à apoptose, além da participação do processo autofágico. Ensaio analisando a expressão de proteínas e genes envolvidos na via de autofagia mostraram que há indução deste processo pelo composto estudado. Quando este processo é inibido farmacologicamente há incremento na morte celular causada pelo 4-NC. Considerando que em câncer, a autofagia é um processo essencial na modulação da resistência a quimioterápicos, descrevemos aqui, que 4-NC, a exemplo de seu poder citotóxico em melanomas, atua no processo invasivo de gliomas e induz morte celular além de desencadear o processo autofágico.

Palavras chave: glioma, invasão tumoral, citotoxicidade, 4-nerolidilcatecol, autofagia

Student: Renato Ramos Massaro

Supervisor: Silvy Stuchi Maria-Engler

Level: Master of Sciences

Title: Effect of 4-nerolidilcatechol on cytotoxicity and inhibition of invasion on human glioma cell lines A172 and T98G

Volume: I **Pages:** 158

ABSTRACT

Gliomas present extensive invasive behavior and the invasion to healthy adjacent neural tissue makes this type of tumor a great challenge for aggressive clinical intervention. Recent studies concerning glioma invasion mechanisms suggest that metalloproteinases (MMPs) have a critical role in this process. MMPs are overexpressed in almost all types of human tumors and many pre-clinical data point to them as functional enhancers to malignant development; then, the inhibition of MMP activity could be adopted as an anti-cancer therapeutic strategy. *P. umbellata* root extract inhibitory activity over MMPs-2 and 9 was previously evaluated in studies from our group by Ropke *et al.* Thus, this dissertation has as an objective to evaluate the cytotoxic effect of 4-nerolidylcatechol (a compound purified from the *P. umbellata* extract), and its potential for MMP inhibition during the invasive process of two human glioma cell lines, characterized for their different invasive levels. Our results show the cytotoxic levels of the crude extract from the root of *P. umbellata* and from the 4-NC isolated from the extract. *In vitro* tumor invasion assay in non-cytotoxic drug concentrations indicate a strong inhibition of this process by the compound. Interestingly, 4-NC did not significantly alter enzyme activity, genetic or proteic expression of the MMPs involved in glioma invasion, or its regulators. The DNA fragmentation assay shows that cells die, in part, due to apoptosis, but autophagy pathway is also involved in cell death. Assays showing expression of proteins and genes involved in the autophagy pathway showed an increase of this process by the compound studied. Pharmacological inhibition of this process leads to an increase in cell death caused by 4-NC. Considering that in cancer, autophagy plays an essential role in the modulation of chemoresistance, we describe here that 4-NC, as described previously for melanomas, acts on glioma invasive process, induces cell death and is capable of up-regulating autophagic process.

Key words: Glioma, tumor invasion, cytotoxicity, 4-nerolidilcatechol, autophagy

ÍNDICE

1 – Introdução	
2.1 – Os tumores de glia	5
2.2 – Metaloproteinases e invasão tumoral	7
2.3 – Regulação das Metaloproteinases de Matriz	10
2.4 – <i>Pothomorphe umbellata</i> e as MMPs	17
2.5 – Autofagia, morte celular e câncer	19
2 – Objetivos Gerais	24
3 – Delineamento Experimental	
3.1 – Citotoxicidade	24
3.2 – Proliferação	24
3.3 – Expressão e atividade de MMPs	24
3.4 – Invasão <i>in vitro</i>	25
3.5 – Morte celular	25
4 – Materiais e Métodos	
4.1 – Obtenção e padronização do extrato de <i>P. umbellata</i>	26
4.2 – Cultivo celular	27
4.3 – Linhagens celulares	27
4.4 – Teste de Citotoxicidade	
4.4.1 – Contagem de células : Método de Exclusão com Azul de	
Tripan	28
4.4.2 – Quantificação de integridade de membrana,	
fragmentação do DNA e ciclo celular por citometria de fluxo	28
4.5 – Tratamento com compostos	29
4.6 – Análise de expressão gênica através de PCR em Tempo Real	
4.6.1 – Extração do RNA total	29

4.6.2 – Transcrição do cDNA para PCR	30
4.6.3 - Reação em cadeia da polimerase	31
4.6.4 - PCR em Tempo Real	31
4.6.5 – Sequência de primers utilizados	32
4.7 – Western Blotting	
4.7.1 – Obtenção dos extratos protéicos	33
4.7.2 – Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e transferência para membrana	33
4.7.3 – Incubação das membranas com anticorpos primários e secundários	34
4.8 – Zimografia	35
4.9 – Invasão <i>in vitro</i> : transwell	35
5 – Resultados	
5.1 – Citotoxicidade do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> nas linhagens de glioma humano A172 e T98G por ensaio de exclusão por Azul de Tripan	37
5.2 – Verificação da presença do 4-nerolidilcatecol no extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	41
5.3 – Citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol nas linhagens de glioma humano A172 e T98G por ensaio de exclusão por Azul de Tripan	42
5.4 – Quantificação da proliferação por contagem total de células das linhagens A172 e T98G	45
5.5 – Integridade de membrana por citometria de fluxo das linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4- nerolidilcatecol.	46

5.6 – Fragmentação do DNA das linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-nerolidilcatecol.	47
5.7 – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-nerolidilcatecol.	49
5.8 – Análise da expressão gênica de enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular (MMPs) por PCR em Tempo Real	50
5.9 – Análise da expressão de proteínas envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular (MMPs) por western blotting	52
5.10 – Análise da atividade de proteínas envolvidas no processo de degradação da matriz extracelulas (MMPs) por zimografia.	56
5.11 – Ensaio de invasão <i>in vitro</i> por câmara de Boyden: invasão tranwell.	60
5.12 – Análise de expressão da proteína envolvida na formação do autofagossomo, LC3, por western blotting.	63
5.13 – Análise da expressão de genes envolvidos no processo autofágico, ATG-7 e Beclin-1, por PCR em Tempo Real.	65
5.14 – Citotoxicidade do 3-MA nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-nerolidilcatecol.	66
6 – Discussão	
6.1 – Citotoxicidade	
Extrato	69
4-Nerolidilcatecol	71
6.2 – Apoptose.	72
6.3 – Proliferação.	74
6.4 – Metaloproteinases de Matiz e Invasão.	76

6.5 – Autofagia.	81
7 – Conclusão	85
8 – Referências Bibliográficas	86
9 – Anexo	96

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Os tumores da glia

O tecido cerebral é composto por dois tipos principais de células: os neurônios e a neuroglia. 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), perfazendo mais de 50% de todos os tumores de cérebro (Lefranc *et al*, 2005). Os gliomas são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em astrocitomas, oligodendromas e oligoastrocitomas (Louis, 2006). Dentre os gliomas, os tumores mais freqüentes 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 constitui uma certeza, começando no menor grau em direção aos tumores de maior grau, podendo variar em sua taxa de progressão (Rao, 2003; Guillemin *et al*, 2008). Os astrocitomas geralmente apresentam altas taxas de invasão local, que resulta no seu reaparecimento no mesmo local de onde foi retirado (Giese *et al*, 1996; Wang *et al*, 2003) ou até em regiões distantes da lesão primária, podendo re-aparecer até no hemisfério contralateral (Lefranc *et al*, 2005). Os astrocitomas de alto grau (GBMs) são o tipo mais freqüente de tumores primários de cérebro em adultos (Cordes *et al*, 2003; Wang *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 deleções, amplificações e mutações de ponto (Holland, 2000).

A matriz extracelular (MEC) do sistema nervoso central (SNC) apresenta uma diversidade de moléculas de proteoglicanos do tipo condroitin sulfato, ácido hialurônico e outras glicoproteínas multiméricas do tipo tenascina (Sanes, 1989).

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 metaloproteinases de matriz (MMPs), os quais degradam os componentes da MEC, incluindo proteoglicanos e tenascina bem como fibronectina e laminina (Vaday & Lider, 2000), que atuam em clássicos exemplos fisiológicos como o cone de migração do crescimento axonal e a neuritogênese, mas também estão associados aos processos de invasão tumoral (Romanic & Madri, 1994).

As MMPs são super expressas em quase todos os tumores humanos e vastos dados pré-clínicos as apontam como contribuidores funcionais do desenvolvimento maligno, portanto, a inibição de atividade de MMPs tem sido adotada como uma estratégia de terapêutica anti-câncer. Muitos estudos apontam para o fato de, em gliomas, o aumento da expressão de MMPs estar correlacionado com o aumento da agressividade do tumor. As duas gelatinases, MMP-2 e -9, foram identificadas como fatores majoritários em gliomas de alto grau de invasão (Levicar *et al*, 2003).

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). Neste aspecto, a família das metaloproteases e seus inibidores endógenos implicados na regulação de vários passos cruciais no processo de carcinogênese, as torna bons alvos de pesquisa em terapêutica anti-câncer (Rooprai *et al*, 2002).

Duas linhagens celulares de gliomas humanos foram descritas por apresentarem características especiais: a T98G, uma linhagem

invasiva, enquanto A172, não invasiva em substratos de matriz extracelular.

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. 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). Dados de nosso laboratório, publicados por Corrêa *et al*, 2006, mostram que os níveis de expressão de *MMP-2* e *-9*, bem como os níveis de atividade destas enzimas são maiores na linhagem invasiva T98G e menores em A172. Assim, tais linhagens são bons modelos para investigação de compostos inibitórios de MMPs.

1.2 – Metaloproteínases e invasão tumoral

Para que ocorra invasão tumoral e metástase, é necessária extensiva degradação da lâmina basal e da MEC, que funcionam como uma barreira física para a migração celular (Itoh & Nagase, 2002). Durante o processo de metástase, uma célula tumoral (ou uma massa de células) se separa das demais, penetra na lâmina basal, atravessa o estroma e finalmente entra na circulação sanguínea (Brummer *et al*, 2002; Nabeshima *et al*, 2002).

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

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares, como as serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteases dependentes de zinco, enzimas-chave que são responsáveis pelo colapso da MEC e que exercem um papel chave no desenvolvimento e na progressão de malignidades humanas. No câncer, inclusive no caso de gliomas, acredita-se que a alteração dessas proteases altera a regulação da proteólise e degradação da MEC, potencializando a invasão e metástase (Benaud *et al*, 1998; Baker *et al*, 2002; Mysliwiec *et al*, 2002; Singer *et al*, 2002; Itoh *et al*, 2002; Kim *et al*, 2007).

As MMPs compreendem um grupo de enzimas proteolíticas dependentes de Zn^{2+} que, de acordo com a especificidade do substrato e a homologia de domínios, são subdivididas em collagenases, gelatinases, elastases, estromelisinas e MMPs (Benaud *et al*, 1998; Brummer *et al*, 2002). Um grande número de genes (23) de MMPs foram identificados em humanos, muitos dos quais estão implicados em câncer (Itoh & Nagase, 2002).

A degradação da MEC por MMPs não apenas facilita a invasão tumoral, mas também afeta o comportamento da célula tumoral e conduz a progressão do câncer (Itoh & Nagase, 2002; Rao, 2003; Takino *et al*, 2004). Assim, tem sido demonstrado que o aumento da expressão e atividade das MMPs é maior em quase todo o tipo de câncer humano em relação ao tecido normal, e associa-se este evento com um pior prognóstico dos pacientes (Blázquez *et al*, 2008).

Através da degradação proteolítica ou ativação da 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; Mueller & Fusening, 2004). É patente o papel 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 *et al*, 2002). Foi demonstrado que o cultivo em substrato tridimensional de colágeno tipo I promove a indução e ativação de MT1-MMP (MMP-14) e de MMP-2 em células endoteliais de rato, porém na presença de Matrigel tridimensional o mesmo não foi observado (Haas *et al*, 1998).

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).

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 tem sido utilizada na prevenção e/ou contenção de metástases é o uso de inibidores sintéticos de MMPs, tais como batimastat, marimastat ou Ilomastat (Rasmussen & McCann, 1997; Fassina *et al*, 2000; Munshi *et al*, 2004). As MMPs não são produzidas apenas pelo epitélio maligno, mas também, de forma parácrina pelo estroma adjacente, revelando um importante papel da interação célula-célula durante processos não patológicos (Singer *et al*, 2002; DeClerk *et al*, 2004; Mueller & Fusening, 2004).

A metástase pode ser definida como o crescimento progressivo de células em um sítio que apresenta descontinuidade em relação ao tumor primário. As células metastáticas são um grupo especializado de células tumorais da massa de tumor primário, as quais adquiriram a habilidade de completar a cascata de múltiplos estágios da metástase (Boyd *et al*, 1996; Price *et al*, 1997; Ruoslahti *et al*, 1996; Chambers, 1999). Estas células podem se dispersar via vasos sanguíneos, linfáticos, ou dentro de cavidades do corpo (Boyd *et al*,

1996; Price *et al*, 1997; Ruoslahti *et al*, 1996; Chambers, 1999). A diferença entre malignidade e metástase é muito sutil. Os patologistas caracterizam malignidade com base em diversos atributos morfológicos, incluindo perda de citologia diferenciada, vascularização, necrose, índice mitótico, aneuploidia e proporção núcleo/citoplasma. A marca indiscutível de malignidade é a invasão das células através da membrana basal e/ou metástase (Welch *et al*, 2000)

1.3 - Regulação das Metaloproteinases de Matriz

Diversas proteases estão envolvidas no processo de remodelamento da matriz extracelular, porém, o mais expressivo é o das metaloproteinases de matriz, também chamadas de matrixinas (Murphy & Nagase, 2008). Existem, no genoma humano, 24 genes que codificam para MMPs, sendo que um deles é o que codifica para a MMP-23 que está duplicado (Murphy & Nagase, 2008). Atribui-se às MMPs outras atividades além da degradação de componentes da matriz extra-celular (MEC) como acreditava-se inicialmente. Elas podem modular a biodisponibilidade de diversas moléculas e conjuntamente podem influenciar o comportamento celular de várias formas (Murphy & Nagase, 2008), e modular a progressão tumoral em diversos estágios (Coussens *et al*, 2002). O contato célula-MEC pode promover diversas sinalizações celulares que podem ser ativadas e moduladas por MMPs, como diferenciação, migração e mobilização celular (Yan & Boyd, 2006). Na progressão tumoral, as MMPs atuam muito além da degradação da membrana basal para o escape das células do tumor. Segundo trabalhos de revisão como (Coussens *et al*, 2002 e Murphy & Nagase, 2008), as MMPs podem mediar vias como a de morte celular, proliferação, diferenciação, angiogênese, estabelecimento e crescimento de lesões metastáticas e

transformação maligna. Diferente do que se pensava inicialmente, na progressão tumoral, não são somente as células tumorais que secretam MMPs, as células do tecido adjacente ao tumor também as produzem (Coussens *et al*, 2002), portanto também são responsáveis pelas alterações que ocorrem no tecido durante a progressão do tumor.

A regulação dessas proteases se dá em quatro principais níveis: 1)-expressão gênica, 2)-compartimentalização (acúmulo pericelular da enzima), 3)-ativação da pró-enzima ou zimógeno e 4)- inativação da enzima (Ra & Parks, 2007).

A expressão dos RNA mensageiros das MMPs está fortemente regulada. Seu controle é dependente do tipo celular específico do tecido ao qual a MMP está associada (Coussens *et al*, 2002). A regulação da expressão gênica é um importante passo na regulação das MMPs, e as regiões promotoras de seus genes contém diversos elementos *cis*, permitindo o controle por uma série de *trans*-ativadores, como AP-1, PEA3, Sp-1, β -catenina/Tcf-4 e NF- κ B (Yan & Boyd, 2006). As regiões promotoras das MMPs podem ser divididas em três grupos de acordo com os elementos nelas presentes, e é interessante observar que promotores de enzimas com funções relacionadas, como MMP-2/MMP-9 (Gelatinases) e MMP-1/MMP-8 (Colagenases) possuem promotores de classes distintas (Yan & Boyd, 2006).

As regiões promotoras pertencentes à primeira classe possuem uma região TATA-box aproximadamente a -30pb do início da transcrição, e uma região de ligação do fator de transcrição AP-1 (Yan & Boyd, 2006). A maioria dessas regiões promotoras também possui um sítio de ligação de PEA-3, que normalmente é adjacente e cooperativo com um dos sítios de ligação para AP-1 no controle da transcrição dessas MMPs (Benbow & Brinckerhoff, 1997; Yan & Boyd, 2006). A segunda classe de promotores também contém a região TATA-box, mas não possui um sítio de ligação do fator AP-1 próximo

a ela. O terceiro grupo não contém a região TATA-box, e a transcrição desses genes podem começar de diversas regiões do gene (Yan & Boyd, 2006). As MMPs pertencentes ao terceiro grupo são as MMP-2, MMP-14 e MMP-28, que são em geral expressas constitutivamente, com apenas uma indução moderada por citocinas e fatores de crescimento (Chakraborti *et al*, 2003; Yan & Boyd, 2006)

Dessa forma, uma grande variedade de citocinas e fatores de crescimento como interleucinas, interferons, EGF, KGF, NGF, HGF, bFGF, VEGF, PDGF, TNF- α e TGF- β podem culminar na ativação dos promotores de MMP através dos fatores de transcrição AP-1 e/ou PEA-3 (Fini *et al*, 1988; Yan & Boyd, 2006). A ativação dos fatores de transcrição é dada em grande parte pela fosforilação destes pela via das MAPKs, que pode ser dada, por exemplo, pela ativação de kinases de adesão focal (FAK) por integrinas (DeMali *et al*, 2003; Van den Steen *et al*, 2002; Yan & Boyd, 2006), ativando assim MMPs graças a interação célula-MEC.

Outras vias, como a do fator nuclear NF- κ B, também são importantes para algumas MMPs. Este fator de transcrição é regulado por vias ativadas por citocinas inflamatórias (Mercurio & Manning, 1999), e a MMP-9 possui um sítio de ligação para NF- κ B a -600pb do início da transcrição, tornando-o responsivo à citocina TNF- α . Em contraste, o supressor de metástase KiSS-1 age inibindo a vida do NF- κ B, reprimindo a expressão de MMP-9 em linhagens de fibrosarcoma. (Yan *et al*, 2001).

Além da região promotora, a expressão gênica pode ser reprimida por fatores epigenéticos, como metilação do DNA, e alteração da estrutura da cromatina por acetilação de histonas (Fuks, 2005). A regulação da expressão gênica de MMPs por fatores epigenéticos é ainda muito pouco estudado, até mesmo pelo fato de seus promotores não conterem sítios CpG para metilação do DNA. Porém, uma correlação fraca entre metilação do promotor da MMP-9 e seu silenciamento já foi observado em linhagens celulares de

linfoma. A reversão do silenciamento de MMP-9 já foi realizado por tratamento com 5'aza-2-deoxicitidina em células que haviam o promotor desse gene silenciado por metilação. O tratamento reverteu a metilação do DNA e restaurou os níveis de mRNA e proteínas das células em questão (Chicoine *et al*, 2002; Couillard *et al*, 2006, Yan & Boyd, 2006).

A regulação dos RNAm também pode dar-se após a sua transcrição. O TGF- β , por exemplo, aumenta os níveis de MMP-2 e MMP-9 principalmente por aumentar a meia-vida das moléculas de RNAm em células de câncer de próstata e fibroblastos humanos da gengiva (Overall *et al*, 1991; Hsu *et al*, 1992).

Estudos *in vitro* já mostraram que há uma sobreposição dos substratos das MMPs, principalmente dos componentes da matriz extracelular (Sternlicht & Werb, 2001). Por outro lado, algumas MMPs têm afinidade muito maior com determinados substratos. Essa seletividade dos substratos pode ser aprimorada pela afinidade das MMPs e por sua compartimentalização, surgindo assim mais uma forma de controle das MMPs (Ra & Parks, 2007).

A compartimentalização, ou seja, quando e onde no ambiente ao redor da célula que as MMPs serão liberadas ou armazenadas é importante para a proteólise dos substratos nos quais as enzimas agirão. É interessante, por exemplo, ancorar na membrana celular MMPs que são liberadas para o meio, aumentando assim sua concentração local. Isso permite que essas enzimas ajam mais eficientemente em um alvo específico no meio extracelular pelo qual a enzima tenha uma alta afinidade (Ra & Parks, 2007). Muitos exemplos de interações de MMPs com proteínas de membrana foram reportados, como de MMP-2 com a integrina $\alpha_v\beta_3$ (Brooks *et al*, 1996), MMP-1 com integrina $\alpha_2\beta_1$ (Dumin *et al*, 2001; Stricker *et al*, 2001); MMP-9 com receptor CD44 (Yu & Stamenkovic, 2000), MMP-7 com proteoglicanos da superfície celular (Yu *et al*, 2002).

Essas âncoras na superfície celular funcionam então como agentes que facilitam a interação entre a proteinase e seu substrato, permitindo que a sua ação seja mais eficiente, tornando esta compartimentalização uma forma de controle da atividade das MMPs.

Como falado anteriormente, as MMPs são proteases que são liberadas na forma de pró-enzimas ou zimógenos. As enzimas são mantidas num estado inativo pela interação entre o grupo tiol da cisteína presente no prodomínio, e o íon de zinco presente no sítio catalítico (Ra & Parks, 2007). Para a ativação das enzimas, essa interação precisa ser rompida, conferindo atividade catalítica ao sítio ativo delas. Esse mecanismo de ativação de todas as proMMPs foi proposto em 1990 por Van Wart e Birkedal-Hansen e é amplamente aceito até os dias de hoje.

Essa ativação pela ruptura da interação pode ser dada por diversas formas. Ativação alostérica, pela alteração na estrutura terciária da proteína, pode ocorrer sem que haja a clivagem do pró-domínio da protease em questão. Porém, essa ativação pode ser revertida, da mesma forma que pode favorecer uma clivagem autolítica do prodomínio permitindo uma ativação definitiva (Ra & Parks, 2007).

Mais de um terço das MMPs possuem uma seqüência de aminoácidos específica que é reconhecido pela furina ou por serina proteases. Essa seqüência fica entre o pró-dominio e a porção proteolítica, e o processamento dessas enzimas e sua ativação pode ocorrer dentro da célula pela clivagem por furina (presente no aparato de Golgi) antes de sua secreção (Thomas, 2002, Sato *et al*, 2003; Illman *et al*, 2003; Ra & Parks, 2007).

A ativação de proMMPs por MMPs ativas, pode ocorrer, mas há uma certa controvérsia. Sabe-se que MMP-3 ativa eficientemente as proMMP-1 e proMMP-7 *in vitro* (Ito & Nagase, 1988; Murphy *et al*, 1997), porém, para a ativação da proMMP-7 é necessária uma concentração muito alta de MMP-3, e um tempo de incubação

prolongado (Imai *et al*, 1995), além disso, a MMP-1 e MMP-7 não são co-expressas com a MMP-3, mostrando que essa forma de ativação *in vivo* é muito pouco provável (Ra & Parks, 2007; Parks, 1999; Dunsmore, 1998).

Para a ativação da proMMP-2 é necessária a formação de um complexo desta proenzima com uma MMP-14 ativa, que cliva o seu pro-domínio, ativando a proMMP-2 (Caterina *et al*, 2000, Ra & Parks, 2007, Wang *et al*, 2000). Essa é uma das formas de ativação de MMPs não dependente de furina mais bem estudados e aceitos, porém, em fibroblastos, a deficiência de MMP-14 não impede a ativação de MMP-2 (Ruangpaint *et al*, 2002), mostrando que sua ativação pode ser dada de outras formas, como por exemplo por outras MMPs de membrana.

A interação entre o tiol do pró-domínio da MMP e o íon de zinco da porção catalítica pode ser quebrada por oxidação do tiol, levando à ativação da enzima. *In vitro*, um número de proMMPs pode ser ativado por espécies reativas de oxigênio, por exemplo, o ácido hipocloroso, um produto da mieloperoxidase de neutrófilos, e radicais hidroxil ativam proMMPs-1,-7 e -9 (Fu *et al*, 2001; Michaelis *et al*, 1992). *In vivo*, no entanto, espécies reativas de oxigênio como ativadores de MMPs não foram estabelecidos (Ra & Parks, 2007).

A última forma de regulação das MMPs é através de seus inibidores. Os dois principais inibidores de MMPs são o α -macroglobulina, e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). O primeiro é um inibidor geral de proteinases que é encontrado no sangue e em fluidos de tecidos (Barret & Starkey, 1973), e as TIMPs são inibidoras de MMPs e, segundo estudos recentes, de um espectro mais amplo de metaloproteinases, como ADAMs e ADAMTs (Jacobsen *et al*, 2008; Wang *et al*, 2006; Kashiwagi *et al*, 2001). Outras proteínas também já foram descritas por inibir MMPs, como é o caso da proteína RECK, que é conhecida por inibir MMPs-2, -9 e -14 (Oh *et al*, 2001) em diversos níveis pós-

transcricionais, por exemplo, na secreção da proMMP-9, na atividade catalítica das três enzimas, e no processo de ativação da proMMP-2 pela MMP-14 (Rhee & Coussens, 2002) e, como descrito recentemente, até em níveis transcricionais, como na transcrição de MMP-9 (Takagi *et al*, 2009); e também como inibidora de MMPs temos uma forma secretada da proteína precursora da β -amiloide, que inibe MMP-2 (Higashi & Miyazaki, 2003 e Ra & Parks, 2007).

Graças à função das MMPs na progressão do câncer e invasão tumoral, bem como em doenças cardiovasculares e artrite, muito foi investido em inibidores sintéticos dessas enzimas, para o seu controle nesses casos. Em modelos animais, esses inibidores demonstraram-se efetivos na prevenção do desenvolvimento e progressão de câncer nos estágios iniciais, porém obtiveram pouco efeito na doença em estágio mais avançado (Murphy & Nagase, 2008). Em testes clínicos esses inibidores não se mostraram efetivos, provavelmente por serem testados em pacientes com tumores em estágio mais avançado da progressão da doença (Coussens *et al*, 2002). Os efeitos colaterais foram dor e inflamação músculo-esquelética (Coussens *et al*, 2002). Esses efeitos são atribuídos ao amplo espectro de ação desses inibidores de MMPs, que vai muito além das 23 MMPs, agindo também sobre ADAMs e ADAMTs, bem como sobre outra metaloenzimas.

Apesar dos inibidores sintéticos de MMPs não terem trazido até agora resultados clínicos tão promissores quanto se esperava, pesquisa-se extensivamente inibidores dessas enzimas para novos testes (Overall & Lopez-Otin, 2002; Murphy & Nagase, 2008). Novos estudos propõem uma seletividade maior das MMPs a serem inibidas, bem como o entendimento mais profundo das MMPs que agem nas diferentes situações e tipos tumorais. A melhor compreensão de sua interação com outras moléculas e das diversas vias de regulação dessas proteases pode proporcionar novos alvos para o desenvolvimento de novas drogas que agem, por exemplo, como

antagonistas que se ligam nos sítios de interação, ou agem sobre as MMPs em outros níveis de regulação que ainda necessitam ser estudados mais profundamente.

1.4 - *Pothomorphe umbellata* e as MMPs

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, e extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. Por outro lado, as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (Di Stasi, 1996).

O Brasil possui uma flora rica em plantas com potencial medicinal, sendo freqüente o uso popular destas para o tratamento de doenças. Especificamente a espécie *Pothomorphe umbellata* (*P. umbellata*) L. Miq., é conhecida popularmente como pariparoba, caapeba, caapeba-do-norte, catajé, malvarisco, capeua, aguaxima, caapeba verdadeira e malvaíско (Panizza, 1998).

A *P. umbellata* é empregada na medicina popular para o tratamento de diversos males, como: insuficiência renal, males do fígado, má digestão, bronquite asmática e, externamente, no tratamento de queimaduras e feridas comuns (Moraes, 1983). A Farmacopéia Brasileira em sua primeira edição oficializou o uso da pariparoba no Brasil, registrando como droga as raízes secas do vegetal (Silva, 1926).

Estudos realizados demonstraram a atividade antioxidante do extrato liofilizado da raiz de *P. umbellata*, quando avaliada em ensaios “*in vitro*”, em parte atribuída à presença do composto fenólico, o 4-nerolidilcatecol (4-NC) (Barros *et al*, 1996).

Visando uma aplicação do extrato de *P. umbellata* como antioxidante para uso tópico, Ropke e colaboradores, em 1998, iniciaram estudos “*in vivo*” de avaliação de atividade antioxidante em pele de camundongos sem pêlo. Este estudo demonstrou que a aplicação tópica de um extrato liofilizado de raiz de *P. umbellata* foi capaz de causar uma redução de 97% nos indicadores de lipoperoxidação, avaliados pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e emissão de quimiluminescência. Esta atividade antioxidante foi 2,5 vezes maior que a do α -tocoferol, aplicado nas mesmas condições, sugerindo o emprego do extrato de pariparoba em formulações cosméticas, com objetivo de combater os efeitos danosos causados por radicais livres.

Em um outro estudo foi demonstrado que a espécie *P. umbellata* foi capaz de inibir a atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2 proveniente de homogeneizados de pele de camundongos em ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*”. Nos ensaios “*in vitro*” o efeito inibitório do extrato de *P. umbellata* foi muito maior que o do 4-nerolidilcatecol isolado (um dos fármacos presentes no extrato), o que sugere a presença de outras substâncias com atividade inibitória de MMPs no extrato (Ropke *et al*, 2005a).

Adicionalmente, Ropke e colaboradores, em 2005, descreveram os efeitos benéficos da utilização da pariparoba através da aplicação tópica, em pele exposta à radiação UVB. Seus resultados demonstram que o gel contendo *P. umbellata* previne o aumento da espessura epidérmica classicamente observada em grupos controle UVB irradiados. Observou-se também a modulação da espessura das fibras elásticas e colagênicas em relação ao controle. Tais alterações mostram que além da capacidade antioxidante da molécula 4NC,

presente no extrato de pariparoba, esta também sugere atividade moduladora sobre os elementos de matriz extracelular da pele.

Os resultados do estudo de fotoenvelhecimento podem estar relacionados à inibição da atividade das MMPs pelo extrato de *P. umbellata*, uma vez que a exposição à radiação ultravioleta é capaz de induzir diretamente ou por geração de espécies reativas de oxigênio, alterações na expressão gênica e protéica da matriz extracelular (Gilchrest *et al*, 1998; Seité *et al*, 2004; Ropke *et al*, 2005)

Assim, no processo de invasão tumoral, da mesma forma que no fotoenvelhecimento, as MMPs podem vir a ser inibidas pelo extrato de raiz de *P. umbellata*, e pelo composto 4-nerolidilcatecol (4-NC), promovendo então a contenção da capacidade invasiva tumoral.

1.5 – Autofagia, morte celular e câncer

O processo de autofagia pode ser considerado uma forma de “autodigestão” celular. Esse nome refere-se a vias de degradação de componentes do citoplasma como proteínas e organelas que são levadas ao lisossomo para sua degradação. Existem pelo menos três formas de autofagia: mediada por chaperona, microautofagia e macroautofagia (Rubinsztein *et al*, 2007; Levine & Kroemer, 2008). Esses processos diferem-se em relação à forma pela qual os componentes citoplasmáticos são levados ao lisossomo (Levine & Kroemer, 2008). Ao longo do texto será referido como autofagia o processo denominado como macroautofagia.

Esta autodigestão pode levar a mais de uma consequência, como adaptação a estresse causado por privação de nutrientes (Mizushima *et al*, 2008 e Okada & Mak, 2004) podendo prevenir a morte celular (Maiuri *et al*, 2007); resistência a quimioterapia em células tumorais (Mizushima *et al*, 2008) ou até uma rota alternativa para morte celular (Okada & Mak, 2004 e Lefranc *et al*, 2005).

No início da (macro)autofagia, uma dupla membrana de origem desconhecida forma uma estrutura chamada fagóforo. Essa membrana se expande seqüestrando partes do citoplasma, como proteínas isoladas ou fragmentos de organelas, formando vesículas chamadas de autofagossomos. Durante a maturação dessa vesícula, proteínas LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) são recrutadas para essa membrana (Rubinsztein *et al*, 2007). Essas vesículas fundem-se com lisossomos, formando o autofagolisossomo, para a degradação de seu conteúdo (Maiuri *et al*, 2007). Dessa forma, as células degradam proteínas que não são mais necessárias para o metabolismo, bem como organelas danificadas (Okada & Mak, 2004). Em todas as células encontra-se um nível basal do processo autofágico, que é necessário e importante para a manutenção da homeostase celular (Mizushima *et al*, 2008).

A autofagia é tida como um processo conservado em diversas espécies, e pode ser ativado, por exemplo, em resposta à falta de nutrientes ou fatores de crescimento (Okada & Mak, 2004). Através da autofagia a célula adapta seu metabolismo à falta de nutrientes no ambiente extracelular, ou à diminuição de metabólitos no ambiente intracelular (Maiuri *et al*, 2007). Pelo catabolismo de macromoléculas, a autofagia gera substrato que supre as necessidades bioenergéticas dessas células (Maiuri *et al*, 2007).

A resistência ao stress conferida pela autofagia tem uma função adaptativa nas células, porém, no contexto do câncer, pode ser considerado potencialmente um mal adaptativo. Em tumores é muito comum o estresse metabólico, e a maioria dos agentes quimioterápicos, bem como radioterapia, induzem estresse celular. Dessa forma, intensas investigações são realizadas no sentido de estudar se a sobrevivência devida à autofagia deve ser bloqueada em tumores para promover a morte celular destas células (Mizushima *et al*, 2008). Recentes estudos mostram que inibição genética ou farmacológica da autofagia aumenta a citotoxicidade de agentes

quimioterápicos no câncer (Mizushima *et al*, 2008, Rubinsztein *et al*, 2007 e Kroemer & Levine, 2008). Num estudo recente, Jie Li e colaboradores (2009) demonstram que a inibição da autofagia pelo composto 3-metiladenina (3-MA) aumenta o efeito da droga 5-fluorouracil (5-FU) na indução de apoptose em células de câncer de colo retal. Da mesma forma, Paglin e colaboradores (2001) verificaram que a inibição de autofagia pelo agente bafilomicina A1 em células de câncer de colo retal, mama e próstata tratadas com radiação γ levou a um aumento do efeito antitumoral, e as células morriam por apoptose (Kondo *et al*, 2005).

A resistência à morte celular, principalmente morte celular por apoptose (morte celular programada tipo I), é uma característica da tumorigênese e do desenvolvimento de resistência a drogas anti-câncer. Desta forma, uma estratégia que induza deliberadamente morte celular não apoptótica em células resistentes à indução desta via, seria uma estratégia muito útil que contribuiria significativamente para futuros tratamentos e terapias anti-câncer (Okada & Mak, 2004). A droga temozolomide (TMZ), por exemplo, é capaz de induzir autofagia, independentemente de apoptose, em gliomas (Kanzawa *et al*, 2004). Da mesma forma, o tamoxifeno (uma droga que tem como alvo receptores de estrógeno) é capaz de induzir morte celular por autofagia em células de câncer de mama (Clarke, 1990; Kondo *et al*, 2005).

Por outro lado, a inibição da autofagia pode levar à resistência dessa via de morte celular, e isso pode levar ao aumento da tumorigênese. O gene beclin 1 (gene ligado ao processo autofágico) se apresenta deletado em 40-75% dos casos de câncer de mama, ovário e próstata em humanos. Camundongos com depleção parcial de beclin 1 tem uma diminuição da autofagia, e são mais susceptíveis ao desenvolvimento espontâneo de tumores (Mizushima *et al*, 2008), indicando que o gene Beclin 1 pode ser considerado um supressor de tumor haploinsuficiente (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009).

Em revisão de Kondo e colaboradores (2005) explicam que a inibição da autofagia proveria aos tumores algumas vantagens para a sua promoção e desenvolvimento. Nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral as células passam por uma fase de aumento de síntese protéica em relação à degradação para o crescimento tumoral (Cuervo, 2004). Além disso, o processo de reciclagem do citoplasma e eliminação de organelas danificadas pela autofagia diminui a produção de estresse genotóxico e radicais livres, que causariam instabilidade genética (Edinger & Thompson, 2003). Dessa forma a inibição da autofagia diminui a degradação protéica e permite o acúmulo de radicais livres, que em conjunto contribuem para o desenvolvimento do câncer.

Em relação à morte celular, a autofagia é considerada uma via alternativa de morte celular programada, sendo classificada por Clarke (1990) como morte celular programada tipo II (Moretti *et al*, 2007). Células que sofrem autofagia excessiva morrem por uma via alternativa à apoptose, levando à uma morfologia celular diferente tanto da morte por apoptose quanto por necrose (Okada & Mak, 2004). Essas células destroem grande parte do citossol e das suas organelas causando atrofia celular com colapso das funções vitais, levando à morte (Maiuri *et al*, 2007).

Diversas vias de sinalização podem culminar no estímulo ou inibição do processo autofágico. Uma delas envolve a via de sinalização de PI3K/Akt/mTOR. Essa via pode ser estimulada por receptores de fatores de crescimento que induzem a fosfatidilinositol-3-kinase da classe I (Class I PI3K), que culminam na indução do alvo da rapamicina de mamíferos (mTOR), que é conhecido por ser um inibidor de autofagia (Martinet *et al*, 2009; Rubinsztein *et al*, 2007; Kondo *et al*, 2005). O supressor de tumor PTEN (phosphatase and tensin homologue) pode modular essa via desfosforilando, e portanto inibindo a PI3K classe I, suprimindo a atividade de Akt sobre mTOR e permitindo a indução da autofagia (Kondo *et al*, 2005). Outra via está

envolvida na formação do fagóforo e vacúolo autofágico, e tem a participação de Beclin 1 e PI3K da classe III. A inibição desta via por drogas, como 3-MA leva à inibição do processo autofágico (Kondo *et al*, 2005). Há, inclusive, relação e sobreposição de vias do processo autofágico com a via sinalizadora da apoptose, sendo que ambas podem ser induzidas por sinais moleculares em comum (Maiuri *et al*, 2007). Por exemplo, reguladores da apoptose como Bcl-2 podem interagir com Beclin-1 inibindo o processo autofágico (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009). Em muitos tecidos in vivo as mortes celulares por autofagia e apoptose coincidem. Até em uma mesma célula podem ser encontrados sinais morfológicos de ambos os processos (Lefranc *et al*, 2005).

Por fim, a indução da autofagia pode estimular também a morte celular por necrose: Leandro e colaboradores mostraram que a catalase (uma enzima que participa do mecanismo de defesa antioxidante celular) é eliminada durante o processo autofágico, e que sua depleção causa morte celular por necrose. A inibição da autofagia, então, preveniria neste caso, a morte celular por necrose (Maiuri *et al*, 2007, Yu *et al*, 2006).

Fica claro que a autofagia tem importantíssima função na indução de morte celular e contenção de tumor. Em células que possuem defeito nas vias de sinalização para a autofagia, a recuperação dessas vias de sinalização para um aumento da autofagia pode ser importante para levar à morte celular ou inibição da proliferação. Em tumores onde a autofagia está presente, ela pode levar à resistência a terapias anti-câncer, portanto a inibição deste processo pode potencializar o efeito do tratamento.

Para a melhoria da terapêutica é necessária uma compreensão mais profunda das vias de sinalização desse processo e a investigação de compostos que possam induzir ou inibir a autofagia é importante para uma melhor concepção de como a autofagia pode estar relacionada à morte celular em câncer (Kondo *et al*, 2005).

2 – OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho consiste em:

Avaliar o efeito do extrato de raiz de *P. umbellata* e do 4-NC como inibidores naturais de MMPs, no processo de invasão tumoral, e seu poder citotóxico como indutor de morte celular (por apoptose ou autofagia) em linhagens de glioma humano A172 e T98G descritas, respectivamente, como menos invasiva e mais invasiva.

3 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Citotoxicidade

A citotoxicidade do extrato de *P. umbellata* e do 4-NC foram verificada nas linhagens de glioma humano A172 e T98G através de experimentos de Azul de Tripán. Foram estabelecidas concentrações para os IC-50 e IC-90 a fim de verificar o potencial citotóxico do extrato da planta e de seu composto isolado em cada linhagem, no intuito do uso de uma concentração que venha a inibir o crescimento e proliferação de células tumorigênicas.

3.2 – Proliferação

Análise das populações de células tratadas com 4-NC nas diferentes fases do ciclo celular, e contagem total de células para verificar o efeito do composto nas diferentes concentrações para avaliar o efeito do composto na proliferação celular.

3.3 – Expressão e atividade de MMPs

Análise da expressão gênica por PCR em tempo real, da expressão protéica por Western Blotting, e da atividade gelatinolítica

de MMPs por zimografia das células tratadas com o composto nas diferentes concentrações.

3.4 – Invasão tumoral *in vitro*

O ensaio de invasão em transwell foi utilizado para verificar se, quando cultivadas nas diferentes concentrações do 4-NC, as linhagens A172 e T98G tem sua capacidade de invasão alterada, já que o composto em questão é conhecido por inibir as gelatinases MMPs -2 e -9 (Ropke *et al*, 2005a) que participam do processo de invasão tumoral de gliomas.

3.5 – Morte celular

Os ensaios da análise da fragmentação do DNA por citometria de fluxo e da expressão protéica de LC3-I/LC3-II por western blotting mostram a morte celular por apoptose e autofagia que ocorrem nas células tratadas com o 4-NC nas diferentes concentrações.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Obtenção e padronização do extrato de raiz de *P. umbellata*

O extrato de *P. umbellata* foi preparado a partir das raízes obtidas no campus da Universidade de São Paulo, situado na Cidade Universitária e uma amostra foi depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O material foi seco e posteriormente moído. O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação etanol: água (1:1), segundo processo "A da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil" (1959), posteriormente concentrado a vácuo e o resíduo aquoso liofilizado. O extrato foi padronizado quanto à concentração de 4-NC, com o emprego de cromatografia líquida de alta eficiência validada em nosso laboratório (Ropke *et al*, 2002), utilizando um padrão de 4-NC previamente isolado (RPI nº 1827, 2006). Resumidamente, o sistema cromatográfico foi composto de bomba Waters Model 510 injector 7161 Rheodyne dotado de loop de 20µL, detector eletroquímico HP 1049^A, constituído de eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP4600 Termoseparation Products. A fase móvel utilizada foi metanol:água 90:10 (v/v), contendo KCl 2mM e LiClO₄ 20mM, com fluxo 1,0 mL/min. Coluna Supelcosil LC-8,3µm, 75x4,6mm (supleco, Bellefonte, PA, USA). O detector eletroquímico foi programado para potencial=0,600V, polaridade=oxidação, modo=amperometria. A padronização foi realizada segundo técnica validada em nosso laboratório.

4.2 - Cultivo celular

As linhagens celulares de glioma humano A172 e T98G foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementadas com soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibióticos (penicilina e estreptomicina). O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de umidade. Os estoques celulares foram congelados em meio de cultura contendo 10% dimetilsulfóxido e 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) em nitrogênio líquido.

4.3 - Linhagens celulares (doadas pela Dra. Mari Cleide Sogayar, Instituto de Química-USP)

A172: (ATCC #CRL 1620) Linhagem celular de origem de glioblastoma cerebral humano, com propriedade aderente, apresenta comportamento não invasivo segundo Nakagawa et al, 1996 e Corrêa et al, 2006. (ATCC).

T98G: (ATCC #CRL 1690) Linhagem celular de origem de 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, e Corrêa et al, 2006

4.4 - Teste de citotoxicidade

4.4.1 – Contagem de células: método de exclusão com Azul de Tripán

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão do corante Azul de Tripán (0,4% Azul de Tripán em PBS pH 7,4) onde as células eram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentavam no seu interior a coloração azul. Sendo assim, foram plaqueadas 40.000 células, em placas de 24 poços com SBF a 2% e 10%. Após 24 horas foi adicionado meio com as diferentes concentrações do extrato. Efetivou-se o tratamento com o extrato ou 4-NC isolado por 24 ou 48 horas e as células foram coletadas. Tanto as células presentes no sobrenadante quanto as células aderidas à placa foram coletadas. À suspensão de células foi adicionado o corante Azul de Tripán (0,4%). As células foram então contadas em câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados, no mínimo, em triplicata biológica e triplicata experimental. Cada suspensão de célula foi contada em 2 campos da câmara de Neubauer. Utilizamos o programa Microsoft Excel, para os cálculos das médias e desvios padrões, e posterior confecção dos gráficos.

4.4.2 - Quantificação de integridade de membrana, fragmentação do DNA e ciclo celular por citometria de fluxo

As células foram tratadas durante 24 e 48 horas com diferentes concentrações de 4-NC obtidas a partir do ensaio de viabilidade. A seguir as células foram coletadas e centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos. O pellet foi ressuspensionado em tampão de lise (tampão fosfato de sódio e 0,1% de SDS) contendo iodeto de propídio (50 µg/ml). Após 30 minutos, a fluorescência foi medida pela citometria de fluxo. A fragmentação do DNA foi analisada utilizando

um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton & Dickinson) com o canal de fluorescência 2 (FL-2) para iodeto de propídio. As análises foram realizadas usando o software "Cell Quest" (Becton & Dickinson), que analisa todas as células adquiridas (10.000/amostra).

4.5 – Tratamento com compostos

As diluições do 4-NC foram realizadas em meio de cultura para que ficassem nas seguintes concentrações (correspondência em $\mu\text{g/mL}$ e μM)

Tabela 1: Concentrações utilizadas de 4-NC em $\mu\text{g/mL}$ e suas concentrações correspondentes em μM

[] $\mu\text{g/mL}$	[] μM
8 $\mu\text{g/mL}$	25,4 μM
10 $\mu\text{g/mL}$	31,8 μM
13 $\mu\text{g/mL}$	41,3 μM
15 $\mu\text{g/mL}$	47,7 μM

No caso da 3-metiladenina (Sigma), utilizou-se o composto na concentração de 2 mM na presença ou ausência do 4-NC na concentração de 13 $\mu\text{g/mL}$.

4.6 – Análise de expressão gênica através de PCR em tempo Real

4.6.1 - Extração do RNA total

Para as células cultivadas em plástico o RNA foi isolado utilizando 1,0mL de solução de TRIZOL para cada 10^6 células (1 placa P100). O homogenato de células com TRIZOL foi então passado para um eppendorf e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos.

Foram adicionados 200 μ L de clorofórmio ao homogenato, que foi vigorosamente invertido e, após 3 minutos de incubação à temperatura ambiente foi centrifugado a 11900 rcf por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior do tubo foi transferida para um segundo tubo, onde foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico. O tubo anterior foi descartado. O tubo novo, depois de ser vortexado, foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugado a 15000 rcf por 15 minutos a 4°C. O RNA precipitou ficando aderido ao fundo do tubo, que foi invertido de forma a eliminar o sobrenadante. O pellet de RNA foi lavado com 1,0 mL de etanol 75% por duas vezes, sendo que da segunda vez o RNA foi ressuspendido nesta solução. Uma última centrifugação foi realizada a 10000 rcf por 8 minutos a 4°C, deixando o pellet de RNA novamente aderido ao tubo, possibilitando que este fosse invertido de forma a eliminar o sobrenadante. O tubo foi mantido invertido por 10 minutos, secando a amostra, que foi ressuspendida em 30 μ L de água milli-Q e estocada em freezer -80°C.

4.6.2 - Transcrição em cDNA para PCR

1 μ g das amostras de RNA foram incubadas com 1U de DNaseI (Life Technologies) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi finalizada com EDTA com uma concentração final de 2mM. A enzima foi subsequentemente inativada e as amostras de RNA tratadas com DNaseI foram submetidas à transcrição reversa com 200U de SuperScriptII (Life Technologies). 1U de RNaseH (Life Technologies) foi adicionada e incubada. As amostras de cDNA foram então diluídas em 40 μ L de Tampão Tris-EDTA.

4.6.3 - Reação em cadeia da polimerase

As reações de transcrição reversa da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador. Alíquotas de cDNA (1 μ l) foram amplificadas numa reação de volume final de 50 μ l contendo 1mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.5 μ l de cada "primer" (20pmol), 5 μ l do tampão de reação 10x contendo 75nM Tris-HCl (pH 9.0), 2mM MgCl₂, 50mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄ e 1.5U da enzima Taq polimerase (Gibco). As amostras foram inicialmente desnaturadas por 5min a 94° C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação, anelamento e extensão, seguidos de extensão final prolongada por 7 min. Os produtos do PCR foram separados em gel de agarose 1.5% e visualizados sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo. O gene do tipo housekeeping GAPDH foi utilizado como controle interno endógeno de expressão constitutiva.

4.6.4 – PCR em Tempo Real

O PCR em Tempo Real foi realizado usando o Syber Green Master Mix PCR (Applied Biosystems), usando primers forward/reverse para os genes estudados numa concentração final de 600nM em um volume final of 12 μ L. O primer correspondente à Tubulina foi utilizado numa concentração final de 800nM em um volume final of 12 μ L servindo como controle interno.

As amplificações foram realizadas em ABI Prism 7500 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems), usando as seguintes condições: desnaturação à 95°C por 10 min, 40 ciclos de 15 seg a 95°C (denaturação) e 60seg a 60°C (anelamento e elongação). A quantificação das amostras foi realizada usando tubulina como controle.

4.6.5 – Sequência de primers utilizados

Nome do Gene		Sequência do primer
hMMP-2	Forward	AGC TCC CGG AAA AGA TTG ATG
hMMP-2	Reverse	CAG GGT GCT GGC TGA GTA GAT
hMMP-9	Forward	CCT GGA GAC CTC AGA ACC AAT C
hMMP-9	Reverse	GAT TTC GAC TCT CCA CGC ATC T
hMMP-14	Forward	GCA GAA GTT TTA CGG CTT GCA
hMMP-14	Reverse	TCG AAG ATT GGC CTT GAT CTC
hTIMP-2	Forward	CGA CAT TTA TGG CAA CCC TAT CA
hTIMP-2	Reverse	GGG CCG TGT AGA TAA ACT CTA TAT CC
hRECK	Forward	TGC AAG CAG GCA TCT TCA AA
hRECK	Reverse	ACC GAG CCC ATT TCA TTT CTG
hATG-7	Forward	ATC TCA GAT GGT CTC ATC ATC GCT CA
hATG-7	Reverse	GAA GAC TTG ACT GGT CTT ACA TTG CTG CAT
hBeclin-1	Forward	TTT CAA GAT CCT GGA CCG TGT CAC CAT
hBeclin-1	Reverse	TTC GCC TGG GCT GTG GTA AGT AAT GGA
hTubulina	Forward	TCA ACA CCT TCT TCA GTG AAA CG
hTubulina	Reverse	AGT GCC AGT GCG AAC TTC ATC

As sequências de primers encontram-se sempre na direção 5' - 3'.

4.7 - Western blotting

4.7.1 - Obtenção dos extratos protéicos

Foram utilizados extratos protéicos totais. As células foram plaqueadas ($1,5 \times 10^6$) em placas de petri de 100 mm e submetidas a tratamento. As células foram lisadas com tampão RIPA+ (NaCl

150mM; Tris HCl (ph 7,5) 50 mM; NP-40 5%; EDTA 0,1mM) na presença de inibidores de proteases (Protease inhibitor cocktail tables –Roche, Mannheim, Germany). Incubadas a 4°C por 20 min e então transferidas para microtubo (1,5 mL). Após centrifugação por 20 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram mantidos a -80°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

4.7.2 - Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e Transferência para membrana

Para separação foi feito gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida. Em cada canaleta foram colocados 30-50µg de extrato protéico total em 20 µl de tampão de lise + 5 µl de tampão de amostra 5X (Tris-HCl 62,5mM pH6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, DTT 50mM) aquecido à 90°C por 10' (condições desnaturantes) e 8µl de marcador de peso molecular Rainbow (RPN800V, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) em cada gel. Somente para a detecção da proteína MMP-9 as amostras não foram aquecidas, e não foi adicionado DTT ao tampão de amostras. A corrida foi feita à 70V / 30min durante o gel de empilhamento e à 100V / 1:30h durante o gel de separação.

Em seguida foi realizada a transferência úmida das amostras de proteína para uma membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) utilizando o Tampão de Transferência (Tris Base 25mM, Glicina 192mM pH8.3, com 20% de Metanol) à 4°C / 200mA / 1:30h.

4.7.3 - Incubação das membranas com anticorpos primários e secundários

O bloqueio das membranas foi realizado com solução de 25 PBS-T 0,2% (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4, Tween-20 0,2%) com 5% de leite (sem gordura).

A membrana foi incubada com:

- 1,3µg/ml de anticorpo monoclonal de camundongo específico para proteína MMP-2 humana - 72kDa (MAB 3308, Chemicon, Temecula, CA) na presença de PBS-T 0,2% + 1% de leite, overnight à 4°C.
- 5 µg/ml de anticorpo policlonal de coelho específico para proteína MT1-MMP humana, que apresenta bandas entre 63 e 60 kDa na pró-forma e 42kDa na forma degradada (AB8345, Chemicon, Temecula, CA) na presença de PBS-T 0,2% + 5% de leite, overnight à 4°C.
- 2 µg/ml de anticorpo monoclonal de camundongo específico para proteína MMP-9 humana, que apresenta banda entre 90 e 92 KDa (Chemicon - Temecula, CA, EUA) na presença de PBS-T 0,2% + 5% de leite, overnight a 4°C
- 1 µg/ml de anticorpo monoclonal de camundongo específico para proteína RECK humana, que apresenta banda de 110 KDa (BD Biosciences - Franklin Lakes, NJ USA) na presença de PBS-T 0,2% + 5% de leite, overnight a 4°C.
- 0,5 µg/ml de anticorpo monoclonal de camundongo específico para a proteína LC3 humana (N-terminal) (Abgent – San Diego, CA, EUA), que apresenta as bandas de LC3-I (18 KDa) e LC3-II (16 KDa).

Após 4 lavagens de 10 min cada com PBS-T 0,02%, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-coelho (NIF 824, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) diluído 1:5000, ou anticorpo anti-camundongo (115-035-062 goat anti-mouse, Jackson

ImmunoResearch Labs) diluído 1:5000 em PBS-T 0,02% durante 1 hora à TA.

Após incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas 4 vezes / 10 min com PBS-T 0,02%, e em seguida reveladas com kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) e expostas ao filme (Amersham Hyperfilm ECL) por 10 minutos (MMP-2), 15 minutos (MT1-MMP) e 15 minutos (MMP-9).

4.8 – Zimografia

As células foram plaqueadas (4×10^4) em placas de 24 wells e submetidas ao tratamento com a droga. O sobrenadante foi coletado em microtubos (1,5 mL) e centrifugado a 1000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo. A concentração protéica foi realizada por método de Lowry.

As amostras (25 µg) foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida e 0,8g/mL de gelatina (substrato das MMPs 2 e 9). A corrida foi realizada à 70V / 30min durante o gel de empilhamento e à 100V / 1:30h durante o gel de separação.

Os géis foram lavados duas vezes com Triton 2,5% por 15 min a 37°C e depois lavados com tampão de incubação (TrisHCl, 0.05 M; CaCl₂ 5 mM; ZnCl₂ 5 mM, pH=8,3) e incubados a 37°C neste tampão por 18h. Os géis foram corados com solução de Coumassie blue. A atividade gelatinolítica foi visualizada como bandas claras no fundo azul do gel.

4.9 – Invasão *in vitro*: transwell

Câmaras de Boyden (8µm, BD) foram colocadas em poços de placas de 24 wells. Polimerizou-se Matrigel® (BD) diluído 1:6 em DMEM sem soro sobre a membrana da câmara. As células A172 (4×10^4) e T98G (1×10^5) foram plaqueadas no compartimento interno

da câmara em uma suspensão de 200uL de DMEM + 10%SBF contendo a droga nas concentrações de tratamento. 300uL de DMEM + 10% SBF com as mesmas concentrações de droga foram adicionados no compartimento externo à câmara de boyden.

Após 24h as células que migraram através do matrigel foram fixadas com glutaraldeído 5% diluído em PBS, lavadas 3X com água destilada e então coradas com solução de azul de toluidina a 2%. Após nova lavagem com água destilada para retirada do excesso de corante, o compartimento interno da câmara foi limpo com hastes de algodão. As células que invadiram foram contadas sob microscopia de luz. Três experimentos foram realizados em duplicata de poços, e 6 campos foram analisados por câmara.

5 – RESULTADOS

5.1 – Citotoxicidade do extrato de *Pothomorphe umbellata* nas linhagens de glioma humano A172 e T98G por ensaio de exclusão de Azul de Tripán.

Após o tratamento das células com o extrato de *P. umbellata* na concentração de SFB a 2% foram obtidos os valores de porcentagem de células vivas plotados na figura 1. Pode ser notado pelo gráfico tanto em 24h como em 48h que os valores de morte celular para a linhagem A172 são maiores que para a linhagem T98G. Da mesma forma, é possível notar que a sobrevivência em ambas as linhagens é menor durante o tratamento com o extrato por 48h, mostrando que este continua agindo sobre as células e matando-as após este tempo.

No tratamento com 10% de SFB, como no caso de 2%, a linhagem A172 morre em concentrações mais baixas que a linhagem T98G, e ambas têm sobrevivência menor em 48h de tratamento, como podemos verificar na figura 2.

Na figura 3, apresentamos um painel de fotos das células cultivadas por 24h a 10% SFB nas concentrações assinaladas de extrato de *P. umbellata*. Podemos notar que a morte celular aumenta conforme a concentração do extrato. Na concentração de 100 µg/ml quase não observamos células mortas, já na concentração de 200 µg/ml a citotoxicidade do extrato já levou todas as células à morte.

Comparando os gráficos das figuras 1 e 2 podemos notar que as concentrações de morte celular a 2% de SFB são muito mais baixas que a 10% de SFB.

Tanto na figura 1 como na figura 2 é possível notar que depois de uma certa concentração do extrato, há uma diminuição da citotoxicidade. Na figura 1, parece haver menor morte na concentração de 60 µg/mL em relação à concentração de 45 µg/mL. Já na figura 2, nota-se um grande aumento na porcentagem de

células viáveis nas concentrações de 140 e 160 $\mu\text{g/mL}$ em relação à concentração de 110 $\mu\text{g/mL}$. Essa falta de congruência na citotoxicidade do extrato é devida à diferença da composição de extratos de diferentes lotes, que será discutida adiante.

Figura 1: Citotoxicidade do extrato de *P. umbellata* nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 2% de SFB.

Figura 2: Citotoxicidade do extrato de *P. umbellata* nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB.

Quanto à morfologia celular (Fig. 3), as células tratadas com o extrato na presença de 10% de SBF, nota-se que nas concentrações mais baixas, não há presença de morte celular. Nesse caso há uma leve alteração morfológica em relação às células não tratadas que pode ser percebida em ambas as linhagens. As células adquirem morfologia mais alongada, e as células da linhagem T98G, que normalmente crescem em "blocos" separados, adquirem morfologia mais alongada e uma disposição um pouco mais esparsa sobre a placa. Nas concentrações mais altas essas características tornam-se mais acentuadas, e observa-se uma grande quantidade de células não aderidas, mostrando o efeito citotóxico do extrato sobre as células.

Figura 3: Células de glioma cultivadas por 24h com extrato de *P. umbellata* a 10% de SBF (porcentagem de células vivas no canto direito inferior)

5.2 – Verificação da presença do 4-nerolidilcatecol no extrato de *Pothomorphe umbellata*

Estudos realizados anteriormente demonstraram que a atividade antioxidante do extrato liofilizado da raiz de *P.umbellata*, quando avaliada em ensaios “*in vitro*”, é em parte atribuída à presença do composto fenólico 4-NC (Barros *et al*, 1996). Assim este composto foi empregado como marcador do extrato. A curva padrão de 4-NC e o cálculo da regressão linear estão apresentados respectivamente na tabela 2 e na figura 4.

Portanto, para verificar a uniformidade do extrato de *P.umbellata* levou-se em consideração a concentração relativa de 4-NC. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um sistema de detecção eletroquímica foi utilizada para esta quantificação.

Tabela 2: Curva padrão de 4-nerolidilcatecol

Concentração do 4-NC	Área do Pico
61,25 µg/mL	644460
30,265 µg/mL	308417
15,31 µg/mL	151894
7,656 µg/mL	82931
3,828 µg/mL	40486

A partir desta curva padrão de 4-NC pode ser calculada a porcentagem deste composto no extrato, para sua padronização. Os extratos liofilizados de duas preparações diferentes foram diluídos em etanol até ficarem na concentração de 300 µg/mL. As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As concentrações e porcentagem de 4-NC no extrato estão plotados na tabela 3.

Figura 4: A - Curva de calibração de 4-NC. Pelo cálculo da regressão linear dos dados da tabela 1, foi obtida a equação da reta ($y=10494x - 3430,6$) e $R^2 = 0,9992$. B - Estrutura química do 4-Nerolidilcatecol.

Tabela 3: Porcentagem de 4-NC presente nas amostras de extrato liofilizado utilizadas no ensaio de citotoxicidade.

Amostra	Área do Pico	Concentração 4-NC	% 4-NC
Extrato A	328944	31,67 µg/mL	10,55 %
Extrato B	188614	18,30 µg/mL	6,10 %

Os valores da porcentagem de 4-NC presentes nos dois extratos liofilizados são diferentes, justificando então a grande variabilidade da citotoxicidade nos experimentos com ele realizados, como mencionado anteriormente.

Vale ressaltar que para esta padronização, a colaboração do grupo da Profa. Silvia Berlanga Moraes Barros (alunos Diogo Pineda Rivelli e Rebeca Leite de Almeida) foi imprescindível.

5.3 – Citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol nas linhagens de glioma humano A172 e T98G por ensaio de exclusão por Azul de Tripan.

O ensaio de citotoxicidade do 4-NC por Azul de Tripan foi realizado com 10% de SFB, e os ensaios com baixa quantidade de soro bovino fetal deixaram de ser realizados, como discutido mais adiante.

Na figura 5 pode-se verificar a citotoxicidade do 4-NC nas linhagens de tumor de glia A172 e T98G nos tempos de 24h e 48h.

Ambas as linhagens apresentaram IC_{50} por volta de 13 $\mu\text{g/mL}$ em 48h de cultivo na presença de 4NC. Observa-se também que a linhagem A172 mostrou um índice de sobrevivência menor em 48h em relação ao tempo de 24h. Já a linhagem T98G, mais invasiva, mostrou o contrário. Para a linhagem T98G os valores de células vivas são um pouco maiores em 48h do que em 24h.

Figura 5: Número de células vivas em relação ao controle onde se observa a citotoxicidade do 4-NC nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB.

Na figura 6 podemos visualizar as células sob o efeito do 4-NC nas diferentes concentrações de tratamento, os resultados vão de acordo com os valores obtidos e evidenciados na figura 5. Com relação à morfologia (Fig. 6), assim como nas células tratadas com o extrato de *P. umbellata*, observa-se que as células de ambas as linhagens adquirem morfologia mais alongada em relação às células não tratadas, e essa característica se torna mais proeminente conforme aumenta a concentração de 4-NC.

Figura 6: Células de glioma tratadas por 24h com 4-Neroridilcatecol a 10% de SBF. (porcentagem de células vivas à direita inferior)

5.4 – Quantificação da proliferação por contagem total de células das linhagens A172 e T98G

O corante azul de tripan foi utilizado para a contagem total de células, sendo possível diferenciar as vivas das mortas. Neste ensaio, o objetivo foi avaliar o número total de células comparando as células tratadas com o 4-NC com as não tratadas.

Figura 7: Contagem total das células das linhagens A172 e T98G tratadas com 4-NC nas concentrações apontadas por 24h e 48h. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Pela contagem total de células, comparando-se as células tratadas com o controle podemos verificar que na concentração mais baixa utilizada já observa-se uma tendência à inibição sobre a proliferação das células em questão.

Para a linhagem T98G, podemos verificar que para 24 e 48h, mesmo nas concentrações do composto onde não há morte significativa de células há uma diminuição de até aproximadamente 40% do número total de células, sendo que na concentração mais alta essa inibição chega a aproximadamente 75% (Fig. 7).

Para a linhagem A172 há uma inibição da proliferação também dependente do tempo de cultivo. Na concentração de 8 µg/mL,

quando as células são cultivadas por 24h ainda não há uma diminuição do número total de células, depois de 48h de cultivo, há uma tendência a inibição de aproximadamente 25%. Para a concentração de 10µg/mL, que ainda é uma concentração onde em 24h não ocorre morte celular significativa, o mesmo ocorre, porém após 24h já se observa uma diminuição de aproximadamente 15% no número total de células. Nas maiores concentrações se observa uma diminuição no número total de células de cerca de 40% e 65% respectivamente por tratamentos por 24h e 48h (Fig. 7).

5.5 – Integridade de membrana por citometria de fluxo das linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-neroridilcatecol.

No ensaio de exclusão por azul de tripan a solução penetra nas células corando-as de azul quando a membrana destas está parcialmente degradada. Da mesma forma neste ensaio, o iodeto de propídeo (PI) penetra nas células com membrana instável (mortas). Assim, este ensaio também mostra a citotoxicidade da droga, já que são contadas as células com membrana íntegra (viáveis).

Figura 8: Células vivas em relação ao controle investigado por incorporação de PI. Observa-se o número de células com integridade de membrana nas linhagens de glioma humano A172 e T98G na presença de 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC.

A figura 8 mostra os resultados obtidos para 24h e 48h nas duas linhagens de glioma humano em questão.

Os resultados condizem com o ensaio de exclusão por azul de tripan. Nota-se que a faixa de IC_{50} é próxima aos 13 $\mu\text{g/mL}$ como no ensaio anterior, e que na linhagem A172 a citotoxicidade é maior após 48h de tratamento em relação à incubação desta célula com o composto por apenas 24h. Para a linhagem T98G a variação de morte celular nos diferentes tempos de cultivo é menor.

5.6 – Fragmentação do DNA das linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-neroridilcatecol.

As células cultivadas na presença do composto 4-NC por 24h foram submetidas a tratamento para análise da fragmentação de DNA e então contadas por citometria de fluxo (figuras 9 e 10).

Como podemos verificar, há fragmentação de DNA em ambas as linhagens celulares. A fragmentação de DNA é maior conforme aumenta a taxa de mortalidade da célula, sugerindo que a citotoxicidade do composto leva à morte por apoptose, como discutido mais a diante. A fragmentação do DNA na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ é muito maior na linhagem T98G que na linhagem A172.

No tratamento das células com 4-NC na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ as taxas de morte celular são de cerca de 80% para ambas as linhagens. Nessa mesma concentração, a taxa de fragmentação de DNA, são de ao menos cerca de 25% para a linhagem A172, e 50% para a linhagem T98G. Isso mostra que para a linhagem A172 e T98G podemos ter respectivamente cerca de 55% e 30% das células morrendo por outras vias, que não causam fragmentação do DNA.

Figura 9: Fragmentação do DNA nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC. Notar o aumento da contagem em M1, principalmente nas concentrações de 13 µg/mL 15 µg/mL

Figura 10: Fragmentação do DNA nas linhagens de glioma humano A172 e T98G a 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC

5.7 – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-nerolidilcatecol.

Por citometria de fluxo também foi possível verificar se houve alguma alteração no ciclo celular das linhagens em questão quando estas foram submetidas a tratamento com o 4-NC. Esta análise de ciclo celular faz sentido em situações onde não há alteração significativa na morte celular ou fragmentação do DNA, desta forma tal análise só foi realizada nas células submetidas a tratamento com 10 µg/mL de 4-NC (Figura 11).

Observa-se que mesmo não induzindo efeito real na viabilidade celular pelo tratamento por 24h, na concentração de 10 µg/mL o 4-NC já induz efeitos nas células, refletidos em alterações do ciclo celular. Na linhagem A172 há um aumento de células na fase G1 ($p < 0,05$), mostrando um retardo no ciclo celular. Já na linhagem T98G, observa-se uma diminuição de células na fase G1 (não significativa), e um aumento de células na fase de Síntese ($p < 0,05$).

Tendo efeito no ciclo celular, o composto pode também ter outros efeitos que serão refletidos em alterações de níveis genéticos e protéicos, merecendo assim atenção e estudos mais aprofundados, mesmo não mostrando efeito na morte celular nesta concentração.

Figura 11: Análise das fases do ciclo celular nas linhagens de glioma humano (A) A172 e (B) T98G a 10% de SFB submetidas a tratamento com o composto 4-NC. * - $p < 0,05$.

5.8 – Análise da expressão gênica de enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular (MMPs) por PCR em Tempo Real nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-nerolidilcatecol.

Os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados em células tratadas com meio contendo 10% de SBF e 4-NC nas concentrações de 10 e 13 µg/mL por 24h. A quantificação da expressão desses genes está plotado na figura 12.

As expressões gênicas de MMPs 2, 9 e 14 foram analisadas, bem como de dois reguladores: RECK e TIMP-2. Não se comparou a expressão gênica entre as linhagens pois isso já foi verificado em trabalho anterior de nosso grupo por Corrêa e colaboradores (2006).

A análise da expressão gênica da MMP-2 mostrou que, para a linhagem A172, há um aumento na concentração de 10 µg/mL, e na concentração de 13 µg/mL volta aos níveis basais. Para a linhagem T98G, parece não haver a alteração da expressão gênica dessa MMP.

A expressão gênica da MMP-9 um aumento em ambas as linhagens ($p < 0,05$), quando tratadas com o 4-NC. Esse efeito mostrou-se dose-dependente, sendo que na concentração de 13 µg/mL o aumento de sua expressão em relação ao controle é maior que na concentração de 10 µg/mL.

A MMP-14 não mostrou alteração de sua expressão gênica para a linhagem A172, porém a linhagem T98G teve seus níveis aumentados em relação ao controle em ambas as concentrações de tratamento com o 4-NC ($p < 0,01$).

Os reguladores dessas MMPs RECK e TIMP-2 não mostraram nenhuma alteração significativa em sua expressão gênica em nenhuma das linhagens. Exceto um brando aumento da expressão gênica de RECK na linhagem A172 quando tratada com 4-NC na concentração de 10 µg/mL.

Figura 12: Expressão gênica relativa de A) MMP-2 B) MMP-9 C) MMP-14 D) RECK E) TIMP-2 nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

5.9 – Análise de expressão de proteínas envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular (MMPs) por western blotting.

Os ensaios de western blotting foram realizados em células cultivadas com 4-NC por 24h nas concentrações de 10 µg/mL e 13 µg/mL (Figura 13).

Apesar da tentativa de detecção da proteína RECK, não foi possível verificar seus níveis protéicos de forma reprodutível nessas linhagens. Vale ressaltar que a proteína RECK é apontada como reguladora de MMPs envolvidas no processo tumoral, como revisado por Noda & Takahashi em 2007. A ausência da proteína RECK era esperada, já que diversos trabalhos relatam a diminuição de sua expressão em tumores (revisado por Meng *et al*, 2008), portanto ela não teria uma real função na regulação das MMPs no caso das linhagens utilizadas.

A maior diferença que ocorre dentre estas enzimas é visualizada na MMP-2. Há uma diferença de expressão notável entre as duas linhagens, principalmente da pró-enzima (banda superior) (Fig. 13 e 14A e B). Levando-se em consideração o tratamento com o 4-NC, ambas as linhagens mostraram um aumento desta enzima (ambas as isoformas) quando incubadas com a droga na concentração de 13 µg/mL. Na concentração mais baixa, de 10 µg/mL, somente a linhagem A172 mostrou uma tendência a aumentar a expressão protéica de MMP-2 (Fig. 14 C e D).

Figura 13: Western Blotting das linhagens celulares A172 e T98G cultivadas com as concentrações de 4-NC apontadas.

Figura 14: Expressão protéica relativa de Pró-MMP-2 (A,C) e em sua forma ativa (B,D) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A e B – Expressão em relação à linhagem A172 sem tratamento. C e D – Expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na expressão protéica.

Figura 15: Expressão protéica relativa de MMP-14 em sua pró forma de 60 KDa (A,C) e em sua forma clivada de 42KDa (B,D) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A e B – Expressão em relação à linhagem A172 sem tratamento. C e D – Expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na expressão protéica.

A protease MMP-14 também demonstra alterações entre as linhagens. A linhagem com menor grau de invasividade (A172) tem expressão protéica menor que a linhagem T98G. Essa tendência de maior expressão na linhagem mais invasiva pode ser visualizada tanto em sua pró-forma (60KDa) como em sua forma degradada (42 KDa) (Fig. 13 e 15A e B). O tratamento das células com o 4-NC mostra também uma leve tendência a aumento dessa proteína na linhagem A172 tratada com a droga nas concentrações de 10 µg/mL e 13 µg/mL, porém o mesmo não é observado na linhagem T98G (Fig. 15C e D).

A MMP-9 mostrou uma leve tendência de diferença de expressão protéica entre as linhagens. Na figura 13 observamos que a expressão protéica em ambas as linhagens é muito parecida, não

sendo perceptível nenhuma alteração. Quando quantificadas as bandas, a linhagem T98G, tida como mais invasiva, mostra valores de expressão protéica ligeiramente mais altos que a linhagem A172 (Quantificação na Fig. 16 A). O tratamento com o 4-NC, como observado nas figuras 13 e 16 B, não se mostrou efetivo na modulação da expressão dessa proteína para nenhuma das linhagens em nenhuma das concentrações utilizadas.

Figura 16: Expressão protéica relativa de MMP-9 nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A – Expressão em relação à linhagem A172 sem tratamento. B – Expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na expressão protéica.

5.10 – Análise da atividade de proteínas envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular (MMPs) por zimografia.

Os zimogramas foram realizados com o sobrenadante das células das linhagens A172 e T98G cultivadas por 24h com o 4-NC nas concentrações de 10 µg/mL e 13 µg/mL ou sem a adição da droga.

Na figura 17 é possível observar um leve aumento nas bandas de pró-MMP-2 e pró-MMP-9 na linhagem T98G em relação à linhagem A172. Esse aumento não se demonstrou significativo quando as bandas foram quantificadas (Figs. 18A e B e 19A, C e E).

Figura 17: Zimograma das linhagens celulares A172 e T98G cultivadas com as concentrações de 4-NC apontadas

A atividade de MMP-9 (pró e ativa) mostrou uma leve tendência a diminuição na linhagem A172 quando tratada com o 4-NC. Ao contrário, na linhagem T98G parece ter ocorrido uma leve tendência de aumento na atividade (Fig. 18C e D). Essas variações são muito brandas, não podendo ser consideradas significativas e não teriam nenhuma influência na capacidade de invasão das linhagens de glioma em questão.

Da mesma forma, a MMP-2 demonstra apenas algumas alterações brandas quanto sua atividade. A pró-MMP-2 demonstra uma leve tendência a diminuição de atividade em ambas as linhagens quando tratadas com o composto. Já a MMP-2 intermediária demonstra uma tendência ao aumento de atividade em ambas as linhagens quando tratadas com o 4-NC, entretanto a variação entre experimentos é muito grande. A MMP-2 ativa é a que demonstra

menor alteração, apenas um leve aumento na linhagem T98G tratada com a concentração de 13 $\mu\text{g/mL}$ do 4-NC.

Figura 18: Atividade protéica relativa de MMP-9 em sua pró forma (A,C) e em sua forma ativa (B,D) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A e B – Atividade em relação ao controle (DME + 10% SBF). C e D – Atividade em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na atividade enzimática

O tratamento com o 4-NC não foi capaz de alterar a atividade de nenhuma das gelatinases em questão nas concentrações utilizadas. Somente variações brandas foram detectadas, sem nenhuma significância para alteração no processo invasivo destas células.

Figura 19: Atividade protéica relativa de MMP-2 em sua pró forma (A, B), em sua forma intermediária (C, D) e em sua forma ativa (E, F) nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-NC apontadas. A, C e E – Atividade em relação ao controle (DME + 10% SBF). B, D e F – Atividade em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto na atividade enzimática

Tabela 4: Modulação da expressão e atividade das MMPs e seus reguladores analisados nos diversos níveis nas linhagens de glioma humano A172 e T98G tratadas com 4-NC.

	MMP-2		MMP-9		MMP-14		RECK		TIMP-2	
Expressão Gênica	=	=	↑	↑	=	↑	=	=	=	=
Expressão Protéica	↑	↑	=	=	↑	=	X	X	X	X
Atividade Enzimática	=	=	=	=	X	X	X	X	X	X
	A172	T98G	A172	T98G	A172	T98G	A172	T98G	A172	T98G

O resumo dos resultados obtidos da regulação das MMPs e seus reguladores nos diversos níveis encontram-se na Tabela 4. Esses resultados mostram que a alteração das MMPs em um nível não necessariamente reflete a alteração da MMP no nível seguinte. Apesar de alterações nos níveis protéicos ou gênicos, as MMPs 2 e 9 não mostraram alterações em sua atividade.

5.11 – Ensaio de invasão *in vitro* por câmara de Boyden: Invasão Transwell

Para o ensaio de invasão transwell as células foram plaqueadas em meio de cultura contendo o composto nas concentrações de 10 µg/mL e 13 µg/mL, e incubadas por 24h para que ocorresse o processo invasivo.

Na figura 20 já é possível perceber a intensa inibição da invasão que ocorre no tratamento com o 4-NC. Já na menor concentração de tratamento, 10 µg/mL, é possível verificar a quantidade menor de células que atravessou o substrato de Matrigel®. Para ambas as linhagens o mesmo ocorre de maneira muito mais intensa na

concentração de 13 $\mu\text{g/mL}$ de 4-NC, mostrando um efeito dose-dependente desse composto na inibição da invasão dessas linhagens de glioma.

A quantificação da invasão foi realizada por contagem de células em seis campos diferentes de cada uma das câmaras de Boyden das três replicatas experimentais. Essa quantificação mostrou uma redução da invasão de 50% na linhagem A172 e 40% na linhagem T98G quando tratadas com o IC_{10} (10 $\mu\text{g/mL}$), concentração que não leva a alteração na taxa de morte celular. Já no tratamento com o IC_{50} (13 $\mu\text{g/mL}$) há uma diminuição de 90% da invasão para ambas as linhagens

Testes estatísticos foram realizados (One way ANOVA) no intuito de avaliar a significância desses resultados. A inibição de invasão da linhagem A172 mostrou-se significativa para ambas as condições de tratamento: em 10 $\mu\text{g/mL}$ - $p < 0,01$; e em 13 $\mu\text{g/mL}$ - $p < 0,001$. Na linhagem T98G não foi diferente: tratamento com 10 $\mu\text{g/mL}$ - $p < 0,05$ e com 13 $\mu\text{g/mL}$ - $p < 0,001$ (Figura 21).

Figura 20: Invasão em câmara de Boyden (Transwell) sob microscopia de luz em aumento de 20x. Células coradas são as que atravessaram o Matrigel® e a membrana até a região externa da câmara.

Figura 21: Quantificação da invasão em câmara de Boyden (Transwell). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.12 – Análise de expressão da proteína envolvida na formação do autofagossomo, LC3, western blotting

Durante a elongação da membrana do fagóforo, na formação da dupla membrana que envolve o autofagossomo, há lipidação da proteína LC3. Dessa forma é possível verificar por western blotting as duas isoformas dessa proteína, sendo que a isoforma LC3-II aumenta quando ocorre o processo autofágico (Kondo *et al*, 20005; Mizushima & Yoshimori, 2007).

Para esses ensaios células cultivadas com 4-NC por 24h nas concentrações de 10 µg/mL e 13 µg/mL.

A figura 22 mostra as bandas de LC3-I e LC3-II, mostrando que há um aumento da banda inferior (LC3-II) quando ambas as linhagens são tratadas com o 4-NC. Esse aumento é mais pronunciado na concentração de 13 µg/mL. Na linhagem T98G nota-se um leve aumento na isoforma não lipídada desta proteína (LC3-I)

que pode significar um aumento da quantidade total desta proteína nas células, porém este aumento não é tão pronunciado quanto o da isoforma lipidada (LC3-II).

Figura 22: Western Blotting das linhagens A172 e T98G cultivadas com as concentrações de 4-NC apontadas mostrando a proteína LC3 em suas isoformas I e II.

Na figura 23 fica evidente o aumento da banda lipidada de LC3 nas células tratadas com o 4-NC. O aumento dessa banda chega a ser de 4 vezes na linhagem A172 e de até 7 vezes na linhagem T98G quando estas linhagens são tratadas com o composto na concentração de 13 µg/mL. O aumento da intensidade da banda de LC3-II é muito mais visível e pronunciado que o pequeno aumento que ocorre na banda de LC3-I.

Figura 23: Expressão protéica relativa de LC3 em sua forma não lipídica LC3-I (A e B) e em sua forma lipídica LC3-II (C e D). A e C – expressão em relação à linhagem A172 não tratada. B e D – expressão em relação ao controle de cada linhagem, mostrando o efeito do composto. (* $p < 0,05$)

5.13 – Análise da expressão de genes envolvidos no processo autofágico, ATG-7 e Beclin-1, por PCR em Tempo Real.

As células foram tratadas com 4-NC nas concentrações de 10 µg/mL e 13 µg/mL para a análise da expressão de genes envolvidos no processo autofágico.

A figura 25 mostra as expressões relativas dos genes ATG-7 (Fig 24 – A) e Beclin-1 (Fig 24 – B). Nota-se que em ambas as linhagens há um aumento da expressão destes genes nas concentrações utilizadas. O gene ATG-7 mostrou um aumento de expressão que na concentração de 13 µg/mL chega a ser o dobro da presente nas células não tratadas.

O gene Beclin-1 tem um aumento que na concentração de 10 de 4-NC não é muito pronunciado, chegando a 2 vezes e 1,5 vezes maior que no controle para as linhagens A172 e T98G respectivamente. Quando trata-se as células com 13 de 4-NC (IC50) a expressão deste gene é mais pronunciada, chegando a cerca de 4 vezes (A172 - $p < 0,01$) e 5 vezes (T98G - $p < 0,001$) maior que nas células não tratadas, mostrando que há um aumento real da expressão deste gene.

Figura 24: Expressão gênica de (A) ATG-7 e (B) Beclin-1 nas linhagens de glioma A172 e T98G tratadas com 4-NC nas concentrações indicadas.

5.14 – Citotoxicidade do 3-MA nas linhagens de glioma humano A172 e T98G submetidas a tratamento com 4-nerolidilcatecol.

As linhagens de glioma humano A172 e T98G foram tratadas com o 4-NC na concentração de 13 µg/mL, e a essa concentração foi adicionado também o inibidor do processo autofágico 3-MA na concentração de 2 mM. Tal tratamento foi realizado por 24h e 48h de incubação com os compostos.

A figura 25 mostra os valores de viabilidade das células com os diferentes tratamentos em 24h (A) e 48h (B). É possível notar que para nenhuma das linhagens o inibidor de autofagia 3-MA na concentração de 2 mM é citotóxico, nem após 48h de incubação. Como verificado anteriormente, o 4-NC na concentração de 13 µg/mL

é citotóxico para ambas as linhagens, induzindo à morte cerca de 40% das células da linhagem A172, e 50% das células da linhagem T98G em 24h. No tempo de 48h a citotoxicidade aumenta para a linhagem A172, que tem um comportamento de morte celular tempo dependente. Para a linhagem T98G esse efeito não é visível.

É interessante notar que para ambas as linhagens, quando adiciona-se 2 mM da droga 3-MA ao meio de cultura contendo 4-NC na concentração de 13 $\mu\text{g/mL}$, as células mostram uma viabilidade menor. Este efeito é mais visível no tempo de 24h, onde a viabilidade da linhagem A172 é de 64% quando tratadas somente com o 4-NC e 40% quando tratadas com a mistura 4-NC + 3-MA, mostrando uma tendência de incremento na morte celular desta linhagem. Na linhagem T98G acontece o mesmo: quando tratadas somente com 4-NC a viabilidade é de 57%, quando adiciona-se o 3-MA ao meio com o composto a viabilidade é menor, sendo de 41%.

No tempo de 48h também há uma menor viabilidade das células quando estas são tratadas com a mistura 4-NC + 3-MA, porém menos pronunciada. Para a linhagem A172 há 27% de células vivas na presença do 4-NC e 16% na presença da mistura. A linhagem T98G tem viabilidade de 50% na presença do 4-NC e de 27% quando ao 4-NC é adicionado o 3-MA.

Figura 25: Citotoxicidade do 4-NC (13 $\mu\text{g/mL}$), 3-MA (2 mM) e da mistura 4-NC (13 $\mu\text{g/mL}$) + 3-MA (2 mM) incubados por (A) 24h e (B) 48h nas linhagens de glioma humano A172 e T98G.

Esse experimento evidencia que o inibidor de autofagia mostra a capacidade de potencializar o efeito citotóxico do 4-NC, mostrando uma participação do processo autofágico na citotoxicidade deste composto.

6 - DISCUSSÃO

6.1 – Citotoxicidade

Extrato

A maior citotoxicidade do extrato na linhagem A172 em relação à linhagem T98G mostra uma maior susceptibilidade da linhagem A172 e possivelmente uma maior resistência da linhagem celular T98G. Isso concorda com o potencial invasivo das linhagens, uma vez que a linhagem T98G foi descrita por Nakagawa (1996) como portadora de um maior potencial invasivo que a linhagem A172.

A maior citotoxicidade em 2% de SFB mostra que na ausência de soro bovino fetal ou privação de nutrientes as células ficaram mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos do extrato. Uma possível explicação para isso pode ser a maior replicação de células na presença de soro a 10%. Nessas condições as células duplicam-se rapidamente, desta forma a quantidade de células é maior, sendo necessária uma concentração maior de extrato para matá-las. O inverso ocorre na condição de privação de soro: as células têm sua taxa de duplicação muito diminuída e, portanto é necessária uma menor concentração de extrato para matá-las.

A influência do SFB na citotoxicidade de drogas já foi descrita anteriormente. O *tri-n-butyltin* (TBT), um poluente ambiental, teve sua citotoxicidade testada em timócitos de ratos, e esta foi reduzida de forma dose-dependente à medida que a concentração de SFB aumentava. (Umebayashi *et al*, 2004).

Em 2007, Kim e colaboradores demonstraram a ação protetora do SFB sobre células T Jurkat quando tratadas com lisofosfatidilcolina (LPC). Considerando uma mesma concentração, a citotoxicidade induzida por LPC em meio com ausência total de soro (0%) foi de 80 a 90%; em meio com 0,5% de soro, de 70%; e na presença de 5%

de soro, não foi observada citotoxicidade na concentração em questão.

Outro ponto a ser levado em consideração nas figuras 1 e 2, referentes à citotoxicidade do extrato é que os desvios padrões são grandes, mostrando uma grande variação entre experimentos e replicatas biológicas. Para o experimento foram utilizadas duas preparações liofilizadas de extratos diferentes, que foram então eluídas em etanol e DME. Tanto na mesma preparação como em preparações diferentes houve uma variação nos resultados obtidos, desta forma nossos ensaios mostraram que o trabalho com esse extrato tem reprodutibilidade comprometida.

O aumento na viabilidade das células nas concentrações de 60 µg/mL na presença de 2% de SBF (Fig. 1) e 140 µg/mL na presença de 10% de SBF (Fig. 2) é provavelmente devido a diferentes preparações liofilizadas utilizadas. Para uma das preparações as concentrações de 60 µg/mL e 140 µg/mL eram citotóxicas para as células cultivadas em 2% e 10% de soro respectivamente, matando quase a totalidade das células. Para uma segunda preparação utilizada, essas concentrações mostraram-se muito pouco tóxicas, observando-se então um aumento na viabilidade das células nessa concentração, bem como um desvio padrão muito grande. Isso é devido provavelmente à composição não homogênea dos compostos presentes nos diferentes preparados do extrato de *P. umbellata*.

O uso das células cultivadas com apenas 2% de SBF tenta mimetizar as células com deficiência de nutrientes que encontram-se na região mais interna do tumor, longe dos vasos, onde não ocorreu angiogênese, onde o sangue carregando os nutrientes e oxigênio não chega. Como apresentado anteriormente, característica mais importante que atribui alta malignidade e baixa taxa de sobrevida nos glioblastomas é a sua alta capacidade de invasão. A invasão ocorre principalmente nas áreas adjacentes ao tumor, por células da periferia deste. Estas células não possuem deficiência de nutrientes

ou oxigênio, e a essas células, de alta capacidade invasiva, é atribuída a alta malignidade destes tumores. Dessa forma, eliminou-se a variável do soro bovino fetal, utilizando-se para os experimentos seguintes, apenas o cultivo de células com 10% de SBF.

É necessário enfatizar que poucos trabalhos da literatura que utilizam extratos de plantas empregam extratos padronizados quando utilizados em cultura de células. Muitos, como Schinella e colaboradores (2000), citam apenas o método de extração e obtenção do extrato sem quantificar nenhum de seus componentes. Estes pontos, conjuntamente, nos levaram a prosseguir com os ensaios usando apenas o composto 4-NC isolado.

Os extratos de plantas são compostos de diversas substâncias de variadas naturezas químicas (Filip *et al*, 2001). Mesmo que a concentração de 4-NC no extrato fosse equivalente nas duas preparações, os outros compostos poderiam estar presentes em proporções diferentes, o que também justificaria a dificuldade da reprodutibilidade do experimento de citotoxicidade.

4-Nerolidilcatecol

O uso do 4-NC isolado para o teste de citotoxicidade elimina a variável da mistura de substâncias que não podem ser quantificadas no extrato, justificando o procedimento adotado para a continuidade do projeto com o uso deste composto isoladamente, já que a atividade antioxidante e inibitória das MMPs do extrato é atribuída, em parte, a ele (Barros *et al*, 1996).

Na figura 5 nota-se um aumento da quantidade de células vivas da linhagem T98G em 48h de exposição ao 4-NC em relação a 24h, considera-se que há uma recuperação celular após a exposição ao 4-NC por esta linhagem, talvez devido à resistência maior à droga destas células, que já era observada nos ensaios com o extrato. Mais

uma vez estes dados concordam com a característica mais invasiva desta linhagem em relação à linhagem A172.

Para os ensaios realizados com o composto isolado os valores de desvio padrão diminuíram muito em relação aos ensaios realizados com o extrato de *P. umbellata*, porém ainda permanecem grandes. Isso se deve ao fato de uma alta sensibilidade das células à droga. Uma pequena variação na concentração do composto já pode levar a uma grande variação na taxa de sobrevivência das células como bem apresentado na figura 5 para a concentração de 15µg/ml.

No ensaio de citotoxicidade do 4-NC realizado por citometria de fluxo, diferente do ensaio de exclusão por azul de tripan, o desvio padrão foi visivelmente menor. Nos ensaios de azul de tripan há um erro intrínseco da contagem das células, o que aumenta o desvio padrão. No caso da citometria de fluxo as células que incorporaram ou não o PI são contadas de forma automática, eliminando o erro do experimentador e tornando o resultado mais preciso. Porém, os valores de citotoxicidade do 4-NC foram equivalentes ao obtido no ensaio de exclusão por Azul de Tripan, mostrando de mais uma forma que estes dados são congruentes, tendo valores de IC₅₀ próximo a 13µg/ml e do IC₁₀ próximo a 10µg/ml.

Os ensaios de proliferação celular, expressão protéica e gênica e a morfologia celular mostram alterações já em concentrações que ainda não levam à morte celular (10µg/ml). Isso mostra que nesta concentração a droga já tem um efeito sobre as células, podendo estar causando algum tipo de estresse metabólico nelas. Desta forma, pode-se considerar que mesmo não levando à morte celular, as concentrações mais baixas podem ter algum tipo de citotoxicidade sobre as células estudadas.

6.2 – Apoptose

O ensaio de identificação da fragmentação do DNA realizado neste estudo (Figuras 9 e 10) é considerado uma das formas para distinguir a morte celular por apoptose (Okada & Mak, 2004). Um dos ensaios propostos por Krysko e colaboradores (2007) para a possível identificação deste processo de morte celular é a verificação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo

A maior fragmentação do DNA na linhagem T98G em relação à linhagem A172 sugere que esta última pode ter uma resistência maior ao estímulo de morte celular por apoptose, que é característico de diversas linhagens tumorais (Okada & Mak 2004; Lefranc *et al*, 2005; Mathew *et al*, 2007). Essa maior resistência pode ser atribuída a diversos fatores, que serão discutidos mais à diante. (p53 aqui, autofagia no tópico 7.5)

A taxa de morte celular e de não integridade de membrana nas concentrações mais altas de 4-NC é muito maior que a taxa de fragmentação do DNA, mostrando que há outros tipos de morte celular que não apoptose (Krysko *et al*, 2007) como por exemplo morte celular por autofagia ou necrose.

A fragmentação do DNA é um evento que ocorre tardiamente no processo apoptótico. Desta forma, a morte celular por apoptose pode ser maior do que a fragmentação do DNA que é observada em 24h, sendo que nesse tempo, o que pode ter ocorrido é que o processo desta via de morte celular não chegou num estágio avançado o suficiente a ponto de se observar fragmentação do DNA.

O processo apoptótico é em muitos casos induzido pela proteína p53 (Ito *et al*, 2005), que pode ser acumulada na célula, por exemplo, quando há dano no DNA (Maltzman & Cxyxyk, 1984). Se esse acúmulo de p53 for alto o suficiente (devido a um dano severo no DNA) pode haver indução de apoptose pela ativação de caspase-3, e liberação do citocromo-c da mitocôndria (Park *et al*, 2005).

Em muitas linhagens de glioma, a proteína p53 é mutada, como é o caso da linhagem T98G (Ito *et al*, 2005; Park *et al*, 2005). Já a linhagem A172, possui p53 selvagem, e estudos com quimioterápicos que causam dano no DNA podem induzir sua morte por apoptose (Park *et al*, 2005). Por outro lado, é descrito que muitas linhagens com p53 selvagem são quimio-resistentes a várias drogas, e que a indução de p53 não leva necessariamente à morte celular por apoptose, como é o caso da linhagem de glioma U87-MG (Ito *et al*, 2005).

A citotoxicidade e indução de apoptose pelo 4-NC já foi descrita em melanomas anteriormente por nosso grupo (Brohem *et al*, 2009), porém o mecanismo de ação dessa molécula na indução de apoptose não foi esclarecido. No presente caso, o 4-NC gerou uma maior resposta de fragmentação do DNA (interpretado como apoptose) na linhagem T98G (p53 mutante). A menor indução de apoptose com fragmentação do DNA na linhagem A172 pode ser interpretada como uma resistência dessas células com p53 selvagem a essa droga no tempo de 24h (que, nesse tempo, tem menor taxa de morte celular). Por outro lado, a fragmentação do DNA que ocorre na linhagem p53 mutante, bem como a citotoxicidade desta droga para esta linhagem mostra que o 4-NC age em outras vias de indução de morte celular e apoptose independente do acúmulo da proteína p53.

Em estudo de indução de apoptose em linhagens de glioma mutantes e selvagens para p53 realizado em 2005, foi verificado que linhagens p53 mutantes respondiam ao estímulo de apoptose quando este gene era inserido nas células pelo aumento de um modulador de apoptose induzido por p53 (PUMA), enquanto as linhagens selvagens para p53 não respondiam a esse estímulo, não levando ao aumento dessa proteína. Adicionalmente, ambas as linhagens tinham apoptose induzida independentemente da condição da proteína p53 quando a proteína PUMA era expressa nas células (Ito *et al*, 2005), mostrando

que independente de p53, há outras formas de ativação desta e de outras vias de morte celular.

Uma das formas mais comuns de indução de morte celular induzida por drogas que não a apoptose, é a morte celular programada tipo II, ou autofagia (Maiuri *et al*, 2007; Mizushima *et al*, 2008).

6.3 – Proliferação

No tratamento de câncer, o efeito citostático de uma droga é fundamental já que nessa doença um dos maiores problemas é a replicação descontrolada das células. O ciclo celular é controlado em diversos pontos por complexos ciclina/cdks (quinase dependente de ciclina) (Sherr, 1996; Sherr & Roberts, 2004). O estímulo mitogênico leva ao acúmulo de ciclinas D, que se ligam e ativam as CDKs 4 e 6, que são importantes reguladores do começo da fase G1 do ciclo celular (Balk & Knudsen , 2008). Durante o ciclo celular existem inibidores desses complexos, como p21 e p27, que podem impedir a progressão do ciclo celular (Takahashi *et al*, 2009; Grana & Reddy, 1995)

A proteína p53 funciona como um fator de transcrição que pode induzir o aumento de p21^{WAF1/CIP1} quando há, por exemplo, dano no DNA (Park *et al*, 2005). A presença de p53 selvagem na linhagem A172 poderia explicar o aumento de células na fase G1 do ciclo por um aumento dessa proteína. Isso levaria a uma parada do ciclo celular nessa fase, o que está de acordo com a indução de fragmentação no DNA discutida anteriormente.

Dessa forma, a linhagem T98G, que é p53 mutante, não teria a indução dessa proteína, não levando à parada do ciclo celular. Por outro lado, sabe-se também que a expressão de p21^{WAF1/CIP1} pode ocorrer de forma independente de p53 (Park *et al*, 2005), permitindo

a exploração de outras vias de ação do 4-NC que não através da indução de p53.

O papel da proteína p21^{CIP1} como inibidora de complexos CDK/ciclina é considerado um tanto quanto simplificado. Enquanto a p21^{CIP1} inibe, por exemplo, os complexos de CDK2, ela também é importante para promover a formação, ativação, e deslocamento nuclear dos complexos CDK4/6-ciclina-D (Balk & Knudsen , 2008), sendo importante assim na indução da progressão no ciclo celular. Isso mostra que essa proteína, apesar de ser descrita classicamente como inibidora do complexo CDK/ciclina, pode atuar de outras formas, induzindo a proliferação celular.

Diversas outras vias de sinalização são de extrema importância para a progressão do ciclo celular, como a fosforilação e desfosforilação da proteína RB, que encontra-se mutada em diversas linhagens tumorais. Na senescência a proteína RB é desfosforilada, sendo assim ativada, impedindo a transcrição de fatores que promovem o ciclo celular, gerando um efeito citostático onde a célula fica na fase G1, chamado de senescência. Essa ativação da proteína RB é acompanhada por um aumento na expressão de p14 e p16 (Takahashi *et al*, 2009). Desta forma, independentemente da condição de p53 nas linhagens em questão, é possível que a droga gere um efeito citostático nessas células por outras vias.

Apesar da linhagem T98G ser p53 mutante e não apresentar por citometria de fluxo uma parada na fase G1 do ciclo celular, observou-se na contagem total de células uma diminuição de sua proliferação quando as células foram tratadas com o composto. Essa diminuição da proliferação pode ser induzida por várias vias, e pode ocorrer de forma independente da proteína p53.

Outra via que pode regular o ciclo celular, por exemplo, está envolvida com a via de autofagia. No caso de gliomas malignos, por exemplo, a rapamicina pode além de induzir a autofagia através da inibição de mTOR, inibir a proliferação dessas células (Kondo *et al*,

2005; Takeuchi *et al*, 2005). No modelo de câncer de próstata, andrógenos são capazes de induzir acúmulo de ciclina D1 através da ativação do mTOR, levando a eventos que culminam na progressão pra fase S do ciclo celular (Balk & Knudsen , 2008).

Fica claro, então, que há diversas formas de regular o ciclo celular nas células em questão independente das mutações nelas existentes.

6.4 – Metaloproteinases de Matriz e Invasão

Todas as metaloproteinases de matriz analisadas parecem ter maior expressão protéica na linhagem T98G em relação à A172. Essa maior expressão era esperada, dado que a proteína RECK, reguladora destas enzimas, tem expressão diminuída na linhagem T98G, descrita como mais invasiva (Nakagawa *et al*, 1996). Tais dados também vão de acordo com a expressão gênica verificada nessas linhagens anteriormente por nosso grupo no trabalho de Corrêa *et al*, 2006, que mostrou que as MMPs 2 e 9 tinham expressão gênica maior na linhagem T98G quando comparadas com a linhagem A172.

Interessantemente, ao contrário do que havia sido previsto, a enzima MMP-2 demonstrou uma tendência ao aumento de sua expressão protéica com o tratamento em ambas as linhagens. Da mesma forma, houve uma leve tendência de aumento da MMP-14 na linhagem A172. A ausência da proteína RECK era esperada, já que diversos trabalhos relatam a diminuição de sua expressão em tumores (revisado por Meng *et al*, 2008), portanto ela não teria uma real função na regulação das MMPs no caso das linhagens utilizadas.

Em trabalho anterior, Ropke e colaboradores (2005) mostraram a inibição da atividade de MMP-9 na presença, *in vitro*, do 4-NC; no presente trabalho, o composto não mostrou nenhuma modulação na atividade enzimática dessa proteína, mostrando inclusive alteração no padrão de expressão gênica inesperado.

Corrêa e colaboradores em trabalho anterior, verificaram também por zimografia uma diferença significativa na atividade das MMPs 2 e 9 entre as linhagens, mostrando que a linhagem T98G tinha maior atividade de ambas, principalmente de MMP-9. A não detecção desta diferença no presente estudo pode ser explicado pelo fato das células não terem sido privadas de soro fetal bovino (SFB) durante o tratamento, dessa forma há uma quantidade MMPs no meio de cultura com o qual as células foram tratadas (veja canaleta somente com DME), dificultando a visualização da diferença de atividade de MMPs entre as linhagens e entre os diferentes tratamentos.

Como comentado anteriormente, Ropke e colaboradores verificaram o efeito inibitório do 4-NC sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 *in vitro* e *in vivo*. Ao contrário do que era esperado, o tratamento com o 4-NC não levou a uma diminuição da atividade dessas enzimas no presente estudo. Como sabemos, células de diferentes tecidos e com histórico genético diferenciados podem responder diferentemente a drogas.

A importância dessas enzimas no processo de invasão tumoral está em sua atividade, que não se mostrou significativamente alterada pelo tratamento das células com o 4-NC, apesar da alteração na expressão protéica.

Uma explicação para os dados obtidos nesse experimento é o uso de DME com 10% de SBF. Normalmente os zimogramas são realizados com o carenciamento das células para que não haja outras proteínas do soro no meio de cultura, mas somente as proteínas liberadas pelas células presentes na placa. No trabalho em questão, tal procedimento não pôde ser realizado, já que a droga tem seu efeito citotóxico muito aumentado em concentrações de SBF mais baixas.

Desta forma, o ensaio de zimografia como foi apresentado não é muito informativo ou próximo do ideal. Tais dados não significam

que o 4-NC não pode alterar a atividade dessas enzimas neste modelo, mas simplesmente que o “background” da atividade enzimática presente no SBF é muito alta, impedindo a visualização de qualquer diferença da atividade dessas proteases nos diferentes tratamentos.

Resumidamente, o aumento da expressão gênica de uma MMP não significa necessariamente o aumento de sua expressão protéica, como acontece com a MMP-9. Da mesma forma, o aumento da expressão protéica não significa que houve um aumento da expressão gênica, a exemplo do que ocorre na MMP-9. Tanto para a MMP-2 quanto para a MMP-9 houve aumento da expressão em algum dos níveis, porém isso não foi refletido no aumento da atividade dessas enzimas. Isso pode ser explicado pela grande complexidade dos sinais de regulação dessas enzimas em seus diversos níveis, como foi explicado anteriormente.

No ensaio de invasão, a maior concentração da droga é citotóxica para ambas as linhagens. Como já foi ressaltado anteriormente, essa concentração foi utilizada por ser o IC_{50} dessas células. Porém, nota-se na figura que a inibição da invasão nesse caso não é dado somente pela morte das células, já que a inibição da invasão é muito maior que 50%, mostrando que a menor invasividade das células nesse caso não se deve à taxa de morte celular.

No mesmo ensaio, nota-se que a concentração que não é citotóxica para as células (IC_{10}) age sobre a invasão destas células inibindo-a em cerca de 50%, mostrando o potencial da droga como inibidora do processo invasivo nessas linhagens.

Apesar de não haver inibição da atividade das MMPs 2 e 9, que são descritas como principais MMPs que participam no processo de invasão tumoral de gliomas, ocorreu uma inibição significativa no processo invasivo de ambas as linhagens avaliadas. O aumento da expressão protéica da MMP-2 e tendência de modulação de seus

reguladores (MMP-14, TIMP-2 e RECK) não impediram que o composto inibisse significativamente a invasão *in vitro*.

Levando-se em consideração o conjunto de dados poderíamos pensar que a inibição da invasão é dada pela toxicidade da droga, porém ocorre uma inibição visível da invasão em concentração de tratamento onde as células ainda estão viáveis, mostrando que a inibição da invasão não é por efeito tóxico da droga e não devido à morte celular.

Como foi discutido anteriormente, nessa mesma concentração a droga levou a linhagem A172 a um aumento da população de células em G1, e um aumento da população de células da linhagem T98G na fase S do ciclo celular. Dessa forma, a menor taxa de invasão pode ser um reflexo de uma taxa de proliferação celular mais baixa. Embora a diminuição da proliferação celular possa levar à menor invasividade, provavelmente existam outros efeitos do 4-NC sobre as células em questão para que a taxa de invasão em Matrigel® diminua tanto.

O processo de invasão depende de vários outros aspectos e vias de sinalização celular além da degradação enzimática da matriz que as envolve. O processo de invasão depende muito de interação da célula com a matriz extracelular e células em adjacentes, bem como processos que levam à movimentação ativa da célula (Demuth & Berens, 2004).

A inibição da invasão no presente estudo pode ter ocorrido por fatores envolvidos na adesão e migração celulares. Sabe-se que a síntese de compostos da matriz extracelular como fibronectina, colágeno, laminina, conjuntamente com a expressão de integrinas pode afetar a adesão celular, conseqüentemente, a capacidade invasiva das células (Günther *et al*, 2003).

Segundo revisões de Demuth & Berens, 2004 e Günther *et al*, 2003; alterações de vias de sinalização intracelular como PTEN, PI3-Kinase, AKT, Rho-GTPases, podem alterar a motilidade e adesão

celulares, e consequentemente podendo ter um efeito sobre o potencial invasivo das células.

A proteína PTEN (homólogo de fosfatase e tensina) é mutada ou inativa em cerca de 70% dos casos de glioma, e essa falta de atividade está intimamente relacionada com a capacidade invasiva dessas células (Dey *et al*, 2008). Essa proteína desfosforila fosfatidilinositol, e resulta na inibição da via de PI3K/AKT (Vasquez *et al*, 2001; Dey *et al*, 2008). A inibição desta via gera uma maior sensibilidade à apoptose e menor taxa de migração (Demuth & Berens, 2004), o que poderia explicar conjuntamente resultados de fragmentação do DNA aumentada e inibição da invasão pelo 4-NC no presente trabalho.

Em relação às MMPs que influenciam no processo de invasão de tumores de glia, até mesmo a degradação da matriz extracelular por outras enzimas que não as MMPs-2 e 9 podem explicar uma redução na invasão e migração das células. Yeh *et al*, 2009, verificaram que o aumento de MMP-13 induzido pela proteína Leptina, leva a um aumento significativo da migração e invasão de glioma murino sem aumento das MMPs-2 e 9.

Dessa forma, há um grande leque de pontos a serem investigados, além do efeito do 4-NC sobre as MMPs avaliadas nesse trabalho, que podem explicar o efeito inibitório desse composto na invasão tumoral.

6.5 – Autofagia

Durante o processo autofágico ocorre a conversão da forma citoplasmática da proteína LC3 (LC3-I – 18 kDa) para a forma lipídada, que se liga à membrana do pré-autofagossomo e do autofagossomo do LC3 (LC3-II – 168Da) (Chen *et al*, 2008). Essa conversão da proteína é uma das formas mais confiáveis para a análise e quantificação do processo autofágico, e é utilizada em

diversos artigos nos quais se deseja mostrar o aumento da autofagia, inclusive em linhagens de glioma. É um dos experimentos sugeridos para a análise da presença de autofagossomos em linhagens de glioma, já que é a proteína LC3 é relativamente abundante nestas células (Jiang *et al*, 2009). O aumento da banda de LC3-II no presente estudo pelo tratamento com o 4-NC mostra então que há aumento da autofagia ocorrendo nessas células, no sentido em que mais LC3 está sendo lipidado e deslocado para as membranas do autofagossomo.

Da mesma forma que o LC3, Beclin-1 é uma proteína muito importante para o início do processo autofágico. A alteração dos níveis de expressão gênica de Beclin-1 já foi notada em diversos tumores, a diminuição de sua expressão de RNA mensageiro já foi descrita em algumas linhagens de glioblastomas multiformes, ao contrário do que ocorre na maioria dos câncers de colorretal e gástrico, onde há o aumento de sua expressão gênica (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009; Miracco *et al*, 2007).

A proteína codificada por este gene (também conhecido como Atg6) é um componente do complexo que inclui a fostatidilinositol-3-kinase da classe III (PI3K-C3), que é uma das vias de estimulação da autofagia (Rubinsztein *et al*, 2007). Beclin-1 é considerado um supressor de tumor haploinsuficiente (Rubinsztein *et al*, 2007; Chen & Karantza-Wadsworth, 2009) já que camundongos heterozigotos para este gene desenvolvem diversos tipos de tumor, como linfoma, e câncer de fígado e pulmão à medida que envelhecem (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009; Yue *et al*, 2003; Kanzawa *et al*, 2003).

Recentemente, um estudo realizado por Li e colaboradores (2008) mostrou a importância do aumento da expressão gênica de Beclin 1 na indução da autofagia por agentes anti-cancer. Nesse estudo eles mostram que um aumento na expressão de Beclin 1, induzida por JNK (cJun NH2-terminal Kinase) é necessária para a indução de autofagia mediada pela droga topotecan. Isso evidencia a

importância e significância do aumento de sua expressão gênica como uma forma de verificar a presença de autofagia.

O ATG-7 é um gene cuja expressão é necessária para a indução da autofagia, sendo que em estudo de indução de autofagia por substâncias oxidantes, ocorreu diminuição muito expressiva do processo autofágico com sua supressão por RNAi (Chen *et al*, 2008). O atg7 é um homólogo da enzima ativadora de ubiquitina e ele ativa tanto o Atg8/LC3 quanto o Atg12 (Rubinsztein *et al*, 2007). Sua deficiência em hepatócitos de camundongo causa acúmulo de peroxissomos, mitocôndrias deformadas e membranas aberrantes contínuas com o retículo endoplasmático (Levine & Kroemer, 2008), mostrando defeito na reciclagem do citoplasma pelo processo autofágico.

O aumento da expressão gênica de Beclin-1 bem como o aumento de LC3-II, conjuntamente com o aumento da expressão gênica de ATG-7, mostram que há uma indução da autofagia pelo 4-NC, podendo assim ser considerado um novo composto indutor de autofagia.

Como discutido anteriormente é determinante a busca e descoberta de novos compostos indutores de autofagia na pesquisa do câncer. A indução da autofagia pode contribuir muito na terapêutica do câncer e compostos como rapamicina e temozolomide (TMZ), que induzem autofagia, já são utilizados clinicamente, induzindo regressão tumoral.

É importante lembrar que no câncer a autofagia pode ter um papel dual. Por um lado pode funcionar como um supressor de tumor, suprimindo o desenvolvimento tumoral, diminuindo a proliferação ou até levar à morte, dependendo do tipo celular ou de outra terapia associada (Carew *et al*, 2007). Por outro lado pode ter uma função protetora das células, podendo remover organelas danificadas pelo tratamento por câncer e reciclando proteínas e componentes celulares nas células em questão (Kondo *et al*, 2005).

No tratamento das células com o 4-NC conjuntamente com o 3-MA (um inibidor de autofagia), parece haver um aumento da morte celular, mostrando que a autofagia, no caso, esteja sendo induzida conjuntamente com a apoptose verificada anteriormente no ensaio de fragmentação do DNA. Nesse caso a indução da autofagia, como mostra o último experimento, poderia ser considerada como uma forma que a célula encontra para se proteger do dano causado pelo 4-NC. Quando essa forma de proteção é inibida pelo 3-MA, a citotoxicidade do composto aumenta, levando a célula à morte com mais eficiência.

Muitos trabalhos falam de vias de morte celular programada do tipo I (apoptótica) ou do tipo II (por autofagia). Porém, sabe-se também que há uma sobreposição das vias de sinalização dessas duas vias. É possível que o 4-NC seja capaz de induzir ambas as vias, sendo citotóxico, mostrando um potencial de indução de morte celular como o de outras drogas. Já foi observado anteriormente o seu potencial citotóxico em melanomas pela indução de apoptose nessas células (Brohem *et al*, 2008). No caso de gliomas, o 4-NC pode induzir ambas as vias, porém com o bloqueio da indução da autofagia com 3-MA sua citotoxicidade parece tornar-se maior.

7 - CONCLUSÃO

O 4-NC foi capaz de inibir a invasão tumoral de duas linhagens de glioblastoma multiforme, tipo de tumor conhecido por dar uma expectativa de vida de 1 ano após seu diagnóstico justamente pela sua capacidade infiltrativa no cérebro. Ao contrário do que se pensava anteriormente, não houve modulação da atividade das metaloproteinases de matriz 2 e 9.

O composto mostrou efeito anti-*r*poliferativo para ambas as linhagens, mostrando um aumento da população de células na fase G1 do ciclo celular para a linhagem A172.

Além de levar à apoptose, o composto levou a uma forte indução do processo autofágico. Sabe-se que atualmente o uso de drogas pró-autofágicas vem se tornando cada vez mais importante na terapia de câncer. Além de ter um efeito anti-tumoral, esse efeito pode ser aumentado se forem utilizadas em conjunto com outras terapias. Muitas linhagens, por exemplo, são resistentes ao tratamento de drogas que levam à apoptose, nesse caso é muito comum a tentativa de induzir a morte celular pela via da autofagia, promovendo a contenção tumoral.

No caso dos gliomas, a autofagia induzida parece ter um efeito de quimioresistência sobre as células. Sua inibição farmacológica mostra uma tendência a aumentar o potencial citotóxico do 4-NC. No caso de gliomas, diferente do observado para melanoma por Brohem e colaboradores (2009), o 4-NC seria importante indutor de morte celular em conjunto com outro composto, bem como na contenção dos gliomas pelo seu potencial de inibição de invasão e proliferação celular.

8 – 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.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities*. **J Cell Sci.** 2002 Oct 1;115:3719-27.

Balk SP, Knudsen KE. *AR, the cell cycle, and prostate cancer*. **Nucl Recept Signal.** 2008 Feb 1;6:e001

Barros, SBM, Teixeira, DS., Aznar, AE., Moreira Jr., J.A., Ishii, I, Freitas, PCD. *Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq.* **Ciência e Cultura**, 1996., v.48, p.114-116

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.

Benbow U, Brinckerhoff CE. *The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?* **Matrix Biol.** 1997 Mar;15(8-9):519-26

Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M.; *Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression.*; **Cancer Res.** 2008 Mar 15;68(6):1945-52.

Boyd D. *Invasion and metastasis*. **Cancer Metastasis Rev**, 15(1): 77-89, 1996.

Brohem CA, Sawada TC, Massaro RR, Almeida RL, Rivelli DP, Ropke CD, da Silva VV, de Lima TM, Curi R, Barros SB, Maria-Engler SS. *Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines*. **Toxicol In Vitro.** 2009 Feb;23(1):111-9. Epub 2008 Nov 24.

Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. **Cell.** 1996 May 31;85(5):683-93

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

Carew JS, Nawrocki ST, Cleveland JL. *Modulating autophagy for therapeutic benefit*. **Autophagy**. 2007 Sep-Oct;3(5):464-7.

Caterina, J.J., Yamada, S., Caterina, N.C., Longenecker, G., Holmback, K., Shi, J., Yermovsky, A.E., Engler, J.A., Birkedal-Hansen, H., *Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation*. **J. Biol. Chem.** 2000.275, 26416-26422.

Chambers A F. *The metastatic process: basic research and clinical implications.* Oncol Res 11(4): 161-8, 1999.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.* Mol Cell Biochem. 2003 Nov;253(1-2):269-85

Chen N, Karantza-Wadsworth V. *Role and regulation of autophagy in cancer.* Biochim Biophys Acta. 2009 Jan 2.

Chicoine E, Estève PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. *Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression.* Biochem Biophys Res Commun. 2002 Oct 4;297(4):765-72.

Clarke PG. *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms.* Anat Embryol (Berl). 1990;181(3):195-213.

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.

Correa, TCS; Brohem, CA; Winnischofer SMB; Cardeal LBS; Sasahara RM; Taboga SR; Sogayar, MC; Maria-Engler, SS. *Downregulation of the RECK- tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness.* Journal of Cellular Biochemistry, 2006 Sep 1;99(1):156-67

Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y. *The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression.* Biochem Biophys Res Commun. 2006 Apr 21;342(4):1233-9

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations.* Science. 2002 Mar 29;295(5564):2387-92

Cuervo AM. *Autophagy: many paths to the same end.* Mol Cell Biochem. 2004 Aug;263(1-2):55-72.

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.

DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. *Integrin signaling to the actin cytoskeleton.* Curr Opin Cell Biol. 2003 Oct;15(5):572-82

Demuth T, Berens ME. *Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion.* J Neurooncol. 2004 Nov;70(2):217-28.

Dey N, Crosswell HE, De P, Parsons R, Peng Q, Su JD, Durden DL. *The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration.* Cancer Res. 2008 Mar 15;68(6):1862-71.

DI STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.* São Paulo, UNESP, 1996, p.9

Dumin, J.A., Dickeson, S.K., Stricker, T.P., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Roby, J.D., Santoro, S.A., Parks, W.C. *Procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the integrin $\alpha 2\beta 1$ upon release from keratinocytes migrating on type I collagen.* **J. Biol. Chem.** 2001 276, 29368–29374

Edinger AL, Thompson CB. *Defective autophagy leads to cancer.* **Cancer Cell.** 2003 Dec;4(6):422-4.

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.

Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G.; *Phenolic compounds in seven South American Ilex species.;* **Fitoterapia.** 2001 Nov;72(7):774-8.

Freshney R. I. , *Culture of animal cells, a manual of basic technique.* **Wiley-Liss 5th ed.** 2005 p.359-360

Fu, X., Kassim, S.Y., Parks, W.C., Heinecke, J.W., *Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase.* **J. Biol. Chem.** 2001.276, 41279–41287.

Fuks F. *DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes.* **Curr Opin Genet Dev.** 2005 Oct;15(5):490-5

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.

Gilchrest, B.A., Yarr, M. *Ageing versus photoageing: postulated mechanisms and effectors.* **J. Invest. Dermatol. Symp,** 1998.. Proc., Malden, v.3, p.47-51

Grana X, Reddy EP. *Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs).* **Oncogene** 1995;11:211–9.

Guillevin R, Menuel C, Duffau H, Kujas M, Capelle L, Aubert A, Taillibert S, Idhah A, Pallud J, Demarco G, Costalat R, Hoang-Xuan K, Chiras J, Vallée JN.; *Proton magnetic resonance spectroscopy predicts proliferative activity in diffuse low-grade gliomas.;* **J Neurooncol.** 2008 Apr;87(2):181-187.

Günther W, Skaftnesmo KO, Arnold H, Terzis AJ. *Molecular approaches to brain tumour invasion*. Acta Neurochir (Wien). 2003 Dec;145(12):1029-36. Epub 2003 Aug 22.

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.

Higashi, S., Miyazaki, K., *Reactive site-modified tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the cell-mediated activation of progelatinase A.* J. Biol. Chem. 1999;274 (15), 10497–10504.

Overall CM, Lopez-Otin C. *Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era*. Nature Rev Cancer 2002;2:657–672.

Holland EC. *Glioblastoma multiforme: the terminator*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6242-4.

Hsu JC, Bravo R, Taub R. *Interactions among LRF-1, JunB, c-Jun, and c-Fos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration*. Mol Cell Biol. 1992 Oct;12(10):4654-65

Illman, S.A., Keski-Oja, J., Parks, W.C., Lohi, J., *Mouse epilysin (MMP-28) is alternatively spliced and processed by a furin-like pro-protein convertase*. Biochemistry 2003. 375, 191–197.

Ito, A., Nagase, H., *Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogen* 1988.

Imai, K., Yokohama, Y., Nakanishi, I., Ohuchi, E., Fuji, Y., Nakai, N., Okada, Y., *Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin) from human rectal carcinoma cells: activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzyme properties*. J. Biol. Chem. 1995;270, 6691–6697.

Ito H, Kanzawa T, Miyoshi T, Hirohata S, Kyo S, Iwamaru A, Aoki H, Kondo Y, Kondo S. *Therapeutic efficacy of PUMA for malignant glioma cells regardless of p53 status*. Hum Gene Ther. 2005 Jun;16(6):685-98.

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

Jiang H, White EJ, Conrad C, Gomez-Manzano C, Fueyo J. *Autophagy pathways in glioblastoma*. Methods Enzymol. 2009;453:273-86.

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. *Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells*. Cell Death Differ. 2004 Apr;11(4):448-57

Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. *Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide*. Cancer Res. 2003 May 1;63(9):2103-8.

Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, H., Brew, K., *TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5)*. J. Biol. Chem. 2001;276 (16), 12501–12504.

Jacobsen, J., Visse, R., Sorensen, H.P., Enghild, J.J., Brew, K., Wewer, U.M., Nagase, H., *Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants.* **Biochemistry** 2008. 47 (2), 537–547.

Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H., Toge, T., *Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy.*; **Cancer Chemother Pharmacol.** v.50, n.5, p.343-352, 2002.

Kim, SY; Lee, E.J.; Woo, M.S.; Jung JS, Hyun, J.W.; Min, S.W.; Kim, D.H.; Kim, H.S.; *Inhibition of matrix metalloproteinase-9 gene expression by an isoflavone metabolite, irisolidone in U87MG human astroglioma cells.*; **Biochem Biophys Res Commun.** 2008 Feb 8;366(2):493-9

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. *The role of autophagy in cancer development and response to therapy.* **Nat Rev Cancer.** 2005 Sep;5(9):726-34. Review.

Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P.; *Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis.*; **Methods.** 2008 Mar;44(3):205-21

Lefranc F, Brothi J, Kiss R.; *Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis.*; **J Clin Oncol.** 2005 Apr 1;23(10):2411-22

Levicar N, Nuttall RK, Lah TT.; *Proteases in brain tumour progression.*; **Acta Neurochir (Wien).** 2003 Sep;145(9):825-38.

Levine B, Kroemer G. *Autophagy in the pathogenesis of disease.* **Cell.** 2008 Jan 11;132(1):27-42. Review.

Li DD, Wang LL, Deng R, Tang J, Shen Y, Guo JF, Wang Y, Xia LP, Feng GK, Liu QQ, Huang WL, Zeng YX, Zhu XF. *The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells.* **Oncogene.** 2009 Feb 12;28(6):886-98.

Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H. *Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells.* **Ann Surg Oncol.** 2009 Mar;16(3):761-71.

Louis DN. *Molecular pathology of malignant gliomas.* **Annu Rev Pathol.** 2006;1:97-117

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.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G.; *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.*; **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2007 Sep;8(9):741-52

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.

Maltzman W and Cxyxyk L: *UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in non-transformed mouse cells.* **Mol Cell Biol** 4: 1689-1694, 1984.

Martinet W, Agostinis P, Vanhoecke B, Dewaele M, De Meyer GR. *Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential.* **Clin Sci (Lond)**. 2009 May;116(9):697-712

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E.; *Role of autophagy in cancer.;* **Nat Rev Cancer**. 2007 Dec;7(12):961-7

Michaelis, J., Vissers, M.C., Winterbourn, C.C., *Different effects of hypochlorous acid on human neutrophil metalloproteinases: activation of collagenase and inactivation of collagenase and gelatinase.* **Arch. Biochem. Biophys.** 1992.292, 555-562.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ.; *Autophagy fights disease through cellular self-digestion.;* **Nature**. 2008 Feb 28;451 (7182) :1069-75

Mercurio F, Manning AM. *Multiple signals converging on NF-kappaB.* **Curr Opin Cell Biol**. 1999 Apr;11(2):226-32.

Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V, Falzarano SM, Pirtoli L, Tosi P. *Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours.* **Int J Oncol**. 2007 Feb;30(2):429-36.

Moraes, M.S. *Caracterização farmacognostica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* L. Miq.* **São Paulo**, 1983. 112p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)

Moretti L, Yang ES, Kim KW, Lu B.; *Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy.;* **Drug Resist Updat**. 2007 Aug-Oct;10(4-5):135-43

Mueller MM, Fusenig NE. *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer.* **Nat Rev Cancer**. 2004 Nov;4(11):839-49

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.

Murphy, G., Cockett, M.I., Stephens, P.E., Smith, B.J., Docherty, A.J., *Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes.* **Biochem. J.** 1987.248, 265–268.

Murphy G, Nagase H. *Progress in matrix metalloproteinase research.* **Mol Aspects Med.** 2008 Oct;29(5):290-308

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

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. *Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration.* **Pathology International** 52: 255-264, 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, Takahashi C.; *Recklessness as a hallmark of aggressive cancer.;* **Cancer Sci.** 2007 Nov;98(11):1659-65.

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

Okada H, Mak TW.; *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells.;* **Nat Rev Cancer.** 2004 Aug;4(8):592-603

Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. *A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles.* **Cancer Res.** 2001 Jan 15;61(2):439-44

Panizza, S. *Plantas que curam: cheiro de mato.* 15.ed. São Paulo: Ibrasa, 1998. p.159-160

Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Moon SI, Yoo DH, Lee HC, Park IC, Rhee CH, Hong SI. *Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin.* **Int J Oncol.** 2006 Jan;28(1):119-25.

Parks,W.C., *Matrix metalloproteinases in repair.***Wound Repair Regen.** 1999. 7, 423–432.

Price J T, Bonovich M T, Kohn E C. *The biochemistry of cancer dissemination.* **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 32(3): 175-253, 1997

Ra HJ, Parks WC. *Control of matrix metalloproteinase catalytic activity.* **Matrix Biol.** 2007 Oct;26(8):587-96.

Rajcáni J, Krobová J, Málková D, *Distribution of Lednice (Yaba 1) virus in the chick embryo.* **Acta Virol.** 1975 Nov;19(6):467-72

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.

Rao JS. *Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases.* **Nat Rev Cancer.** 2003 Jul;3(7):489-501. Review.

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

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, Overall 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.

Ropke CD, da Silva VV, Kera CZ, Miranda DV, de Almeida RL, Sawada TC, Barros SB. *In vitro and In vivo Inhibition of Skin Matrix Metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* Root Extract.* **Photochem Photobiol.** 2005a Jun 1

Ropke CD, Sawada TC, da Silva VV, Michalany NS, de Moraes Barros SB. *Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse.* **Clin Exp Dermatol.** 2005 May;30(3):272-6

Ruangpanit, N., Price, J.T., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Guenzler, V., Huang, X., Chan, D., Bateman, J.F., Thompson, E.W., *MT1-MMPdependent and -independent regulation of gelatinase A activation in longterm, ascorbate-treated fibroblast cultures: regulation by fibrillar collagen.* **Exp. Cell Res.** 2002. 272, 109-118.

Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. *Potential therapeutic applications of autophagy.* **Nat Rev Drug Discov.** 2007 Apr;6(4):304-12.

Ruoslahti E. *How cancer spreads.* **Sci Am,** 275(3): 72-7, 1996.

Sanes,J.R. *Extracellular matrix molecules that influence neural development.* **Annu Rev Neurosci.**; 12:491-516,1989.

Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., Seiki, M., *Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2).* **FEBS Lett.** 1996. 393, 101-104.

Schinella GR, Troiani G, Dávila V, de Buschiazzi PM, Tournier HA.; *Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*.* **Biochem Biophys Res Commun.** 2000 Mar 16;269(2):357-60

Seite S, Colige A, Deroanne C, Lambert C, Piquemal-Vivenot P, Montastier C, Fourtanier A, Lapiere C, Nusgens B *Changes in matrix gene and protein expressions after single or repeated exposure to one minimal erythematous dose of solar-simulated radiation in human skin in vivo.* **Photochem Photobiol.** 2004 .v.79, p.265-71

Sherr, C. J. *Cancer cell cycles* **Science** 1996 274, 1672-7.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. *Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases* **Genes Dev** 2004 18, 2699-711

Silva, R.A.D. *Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional*, 1926. p.649.

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.

Sternlicht MD, Werb Z. *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* **Annu Rev Cell Dev Biol.** 2001;17:463-516

Stricker, T.P., Dumin, J.A., Dickeson, S.K., Chung, L., Nagase, H., Parks, W.C., Santoro, S.A., *Structural analysis of the $\alpha 2$ integrin I domain:pro: collagenase-1 (MMP-1) interaction.* **J. Biol. Chem** 2001.. 276, 29375-29381.

Takagi S, Simizu S, Osada H. *RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription.* **Cancer Res.** 2009 Feb 15;69(4):1502-8.

Takahashi A, Kato K, Kuboyama A, Inoue T, Tanaka Y, Kuhara A, Kinoshita K, Takeda S, Wake N. *Induction of senescence by progesterone receptor-B activation in response to cAMP in ovarian cancer cells.* **Gynecol Oncol.** 2009 Feb 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

Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease.* **Nat. Rev., Mol. Cell Biol.** 2002. 3, 753-766.

Umebayashi, C., Oyama, Y., Chikahisa-Muramatsu, L., Nakao, H., Nishizaki, Y., Nakata, M., Soeda, F., Takahama, K. *Tri-n-butyltin-induced cytotoxicity on rat thymocytes in presence and absence of serum.*, **Toxicol In vitro.**, v.18, n.1, p.55-61, 2004.

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.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix*

metalloproteinase-9 (MMP-9). **Crit Rev Biochem Mol Biol.** 2002 Dec;37(6):375-536.

Vásquez OL, Almeida A, Bolaños JP. Depletion of glutathione up-regulates mitochondrial complex I expression in glial cells. **J Neurochem.** 2001 Mar;76(5):1593-6

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.

Wang, W.M., Ge, G., Lim, N.H., Nagase, H., Greenspan, D.S., TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. **Biochem. J.** 2006. 398 (3), 515-519.

Weinberg, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254(5035): 1138-46., 1991

Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. **J Biol Chem.** 2001 Jan 12;276(2):1164-72

Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J Cell Physiol.** 2007 Apr;211(1):19-26

Yeh WL, Lu DY, Lee MJ, Fu WM. Leptin induces migration and invasion of glioma cells through MMP-13 production **Glia.** 2009 Mar;57(4):454-64.

Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2006 Mar 28;103(13):4952-7.

Yu, Q., Stamenkovic, I., Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev.** 2000.14, 163-176

Yu, W.H., Woessner Jr., J.F., McNeish, J.D., Stamenkovic, I., CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. **Genes Dev.** 2002. 16, 307-323.

Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Dec 9;100(25):15077-82.

9 – ANEXO

9.1 – Cursos Extra-Curriculares

Participação no workshop: “Emerging novel citotoxic agents with chemotherapeutic potencial: melanoma as a model”, realizado pelo Departamento de Análises clínicas e toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, ministrado pela Dra. Monique Verhagen, realizado nos dias 29 e 30 de janeiro de 2009.

9.2 – Congressos Nacionais

BROHEM, C. A. ; SAWADA, T. C. H. ; MASSARO, R. R. ; ALMEIDA, R. L. ; RIVELLI, D. P. ; ROPKE, C. D. ; SILVA, V. V. ; de LIMA, T. M. ; CURI, R. ; BARROS, S. B. M. ; Maria-Engler, S. S. . Potencial effect of 4-nerolydilcathechol in inhibition of melanoma cell death and invasiveness. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, São Paulo. XIV Congresso SBBC

CORREA, T. C. S. ; MASSARO, R. R. ; BROHEM, C. A. ; SOGAYAR, M. C. ; TABOGA, S. R. ; Maria-Engler, S. S. . Inhibition of cell invasion in an MMP-independent manner in the T98G human glioblastoma cell line overexpressing the reck gene. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, São Paulo. XIV Congresso SBBC, 2008. p. 99-99.

ROPKE, C. D. ; ALMEIDA, R. L. ; RIVELLI, D. P. ; MASSARO, R. R. ; SAWADA, T. C. H. ; SILVA, V. V. ; BARROS, S. B. M. ; Maria-Engler, S. S. . Ação do extrato de *Pothomorphe umbellata* nos componentes da matriz extracelular no processo de cicatrização da pele. In:

Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2007, São Paulo. Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2007. v. 19. p. 84-85.

BROHEM, C. A. ; SAWADA, T. C. H. ; ALMEIDA, R. L. ; MASSARO, R. R. ; RIVELLI, D. P. ; BARROS, S. B. M. ; ROPKE, C. D. ; Maria-Engler, S. S. . Ação do extrato de *Pothomorphe umbellata* sobre fibroblastos humanos dérmicos e na modulação de atividade MMP-2 e MMP-9 em modelo de cicatrização cutânea. In: Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2007, São Paulo. Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2007.

9.3 – Congressos internacionais

TATIANA CORRÊA, RENATO MASSARO, CARLA BROHEM, MARICLEIDE SOGAYAR, SEBASTIÃO TABOGA, MARCELO LAMERS, MARINILCE DOS SANTOS; SILVYA STUCHI MARIA-ENGLER. Glioma migration and invasion inhibition mediated by RECK gene. In: Beatson International Cancer Conference, 2009, Glasgow, Scotland

9.4 – Publicações Científicas

BROHEM, C ; SAWADA, T ; MASSARO, R ; ALMEIDA, R ; RIVELLI, D ; ROPKE, C ; DASILVA, V ; DELIMA, T ; CURI, R ; BARROS, S ; BROHEM, C. A. . Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. Toxicology in Vitro, v. 23, p. 111-119, 2009.

Manuscrito em confecção: TATIANA C. SILVEIRA CORRÊA, RENATO RAMOS MASSARO, CARLA ABDO BROHEM, SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA, MARCELO LAZZARON LAMERS, MARINILCE FAGUNDES DOS SANTOS; SILVYA STUCHI MARIA-ENGLER. Glioma migration and invasion inhibition mediated by RECK gene

9.5 – Experiência Didática

Participação do programa de aperfeiçoamento do ensino (PAE) como monitor da disciplina Citologia Clínica (FBC0532) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, no segundo semestre de 2008 sob supervisão de Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

RENATO RAMOS MASSARO

Certificamos que _____ participou do workshop:
"Emerging novel cytotoxic agents with chemotherapeutic potential: melanoma as a model", realizado
pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
USP, ministrado pela Dra. Monique Verhagen, realizado nos dias 29 e 30 de janeiro de 2009.

São Paulo, 29 de janeiro de 2009.

Dra. Monique Verhagen
Dermatology Department
University of Michigan

Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler
FCF/USP

Profa. Dra. Ana Campa
Chefe de Departamento

Programa:

1. Introduction to cancer and treatments
2. Molecular mechanisms underlying chemoresistance: melanoma model
3. Potential drug targets: overcoming chemoresistance
4. Assessing cytotoxicity of novel compounds: in vitro studies
5. Determining mechanism of cell death
6. Manipulation of gene expression: gene silencing (RNA interference) and protein over-expression using lentiviral-driven vectors.
7. Assessing cytotoxicity in vivo: Xenograft mouse models

Carga horária: 12 horas

XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular

Bourbon Convention
Ibirapuera

São Paulo, SP
27 a 30 de julho de 2008

Certificado

Certificamos que o trabalho

Potencial effect of 4-nerolydilcatechol on inhibition of melanoma cell death and invasiveness
de autoria de

Carla Abdo Brohem, Tânia Cristina Higashi Sawada,
Renato Ramos Massaro, Rebeca Leite de Almeida, Diogo
Pineda Rivelli, Cristina Dislich Ropke, Vanessa Vitoriano
da Silva, Thaís Martins de Lima, Rui Curi, Silvia Berlanga
de Moraes Barros, Silvy Stuchi Mar

foi apresentado na forma de pôster,
durante o XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, realizado na
cidade de São Paulo, de 27 a 30 de julho de 2008.

São Paulo, 30 de julho de 2008

Estela Bevilacqua

Vílma R. Martins

21º Congresso Brasileiro de Cosmetologia

Cosmetologia: Integrando Ciência e Arte a Novos Mercados

15 a 17 de maio de 2007

Transamérica Expo Center - São Paulo - SP - Brasil

Certificamos que Renato Ramos Massaro
participou do 21º Congresso Brasileiro de Cosmetologia,
realizado em São Paulo - SP no período de 15 a 17 de maio de 2007,
na qualidade de Co-autor do Pôster: "Ação do Extrato de Pothomorphe umbellata
nos Componentes da Matriz Extracelular no Processo de
Cicatrização da Pele."

Realização

abc

associação brasileira de cosmetologia
www.abc-cosmetologia.org.br

São Paulo, 17 de maio de 2007.

Jadir Nunes
Presidente da ABC

Alberto K. Kurebayashi
Coordenador Geral do Congresso

Adeline K. Nakano
Coordenador Científico

CANCER RESEARCH UK
BEATSON INTERNATIONAL CANCER CONFERENCE

Co-sponsor
 ASSOCIATION FOR INTERNATIONAL CANCER RESEARCH

SCIENTIFIC COMMITTEE

Brad Ozanne
 Kurt Anderson
 Gareth Inman
 Robert Insall
 Laura Machesky
 Jim Norman
 Michael Olson
 Owen Sansom

CONFERENCE CO-ORDINATOR

Tricia Wheeler
 Beatson Institute for Cancer Research
 Garscube Estate, Switchback Road,
 Bearsden, Glasgow G61 1BD
 Tel: +44(0) 141 942 0855 (24 hr)
 Fax: +44(0) 141 330 6426
 Email: t.wheeler@beatson.gla.ac.uk
www.beatson.gla.ac.uk/conf

Receipt for Registration Payment

**Beatson International Cancer Conference:
 Microenvironment, Motility and Metastasis**
 Sunday July 5 – Wednesday July 8 2009
 Glasgow, Scotland

Date: 12 May 2009

To:
 Dr Silvy Maria-Engler
 Department of Clinical Chemistry & Toxicology
 School of Pharmaceutical Sciences
 University of Sao Paulo
 AV Lineu Prestes
 580 Bloco 17
 Brazil

This receipt guarantees your place at the events indicated below and confirms the accommodation you have requested.

Registration:	£380.00
Accommodation:	n/a
Attending Conference Dinner:	Yes
Additional Accommodation:	n/a
TOTAL PAID	£380.00

We look forward to welcoming you to the 12th Beatson International Cancer Conference in July.

Regards

Tricia Wheeler

Tricia Wheeler
 Conference Co-ordinator

Beatson
 the
 institute for cancer research

AICR
*Cancer knows no boundaries.
 Fortunately, neither do we.*

CANCER RESEARCH UK

RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion

Tatiana Corrêa¹, Renato Massaro¹, Carla Brohem¹, MariCleide Sogayar², Sebastião Taboga³, Marcelo Lamers⁴, Marilice dos Santos⁴, Silvy Stuchi Maria-Engler¹ ¹Dept of Clinical Chemistry & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, ²Chemistry Institute, Biochemistry Department, University of São Paulo, ³Department of Biology, IBILCE—University State of São Paulo, São José do Rio Preto, ⁴Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil;

RECK is an important tumor suppressor gene which anti-tumoral activity is associated to its anti-MMPs activity; regulating at least MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP activities. Lack of functional *RECK* compromises tissue integrity, in part due to elevated MMP activity. T98G cell line, derived from a human glioblastoma multiform (GBM), was described as a highly invasive glioma cell line, which displaying high levels of MMP-2 and -9. In glioma progression from less invasive grade II gliomas to very invasive GBMs, *RECK* level decrease (Gabrieli et al, 2008). This inverse correlation between *RECK* expression and glioma invasiveness conducted to this study to explore *RECK* forced expression in T98G invasive human glioma cell line, hypothesizing that *RECK* would compromise the invasive behavior. The expression of *RECK*, MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP was assessed by qPCR and by western blotting in T98G/*RECK*+ (stable transfection of T98G cells overexpressing *RECK*). The invasion and migration capacity of T98G/*RECK*+ cells were inhibited in transwell assay. Important cytoskeleton modifications were also observed in T98G/*RECK*+ cells but not on the control cells. Actin arrangements representing stress fibers on the positive clones may be responsible for motility alteration pattern observed. Surprisingly, besides those facts, no alteration on MMPs gene expressions at the mRNA level (qPCR) was observed in T98G/*RECK*+, neither on protein levels nor on protein activity (western blotting and gelatin zymography, respectively). In this glioma model, the overexpression of *RECK* has no effect over MMPs 2 and 9. On the other hand, it has effectively inhibited the invasive process through rearrangement of the actin filaments, promoting the inhibition of migratory ability. This work has related *RECK* expression with the inhibition of motility and invasion, which are two glioma characteristics responsible for the inefficiency of current available treatments.

FAPESP (Project Grant No. 06/50915-1 and Tatiana C. S. Corrêa's Fellowship 05/51194-3), CNPq, CAPES and PRP-USP

Thank you, your payment was successful
Merchant's Reference: ~~conference booking~~
WorldPay Transaction ID: 1012763913

Please contact WorldPay immediately if there has been a problem making your payment.

For further information about Verified By Visa authentication and details on how you can enrol, visit
<http://www.visaeurope.com/merchant/handlingvisapayments/cardnotpresent/verif>

Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines

C.A. Brohem^{a,1}, T.C.H. Sawada^{a,1}, R.R. Massaro^a, R.L. Almeida^a, D.P. Rivelli^a, C.D. Ropke^a, V.V. da Silva^a, T.M. de Lima^b, R. Curi^b, S.B.M. Barros^a, S.S. Maria-Engler^{a,*}

^a Department of Clinical Chemistry and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008

Accepted 13 November 2008

Available online 24 November 2008

Keywords:

4-Nerolidylcatechol

Pothomorphe umbellata

Melanoma

Invasion

Cytotoxicity

Apoptosis

MMPs

ABSTRACT

Pothomorphe umbellata, a native Brazilian plant, is popularly known to be effective in the treatment of skin lesions. This benefit is attributed to 4-nerolidylcatechol (4-NC), a compound extracted from *P. umbellata*. Since melanomas show prominent resistance to apoptosis and exhibit extreme chemoresistance to multiple forms of therapy, novel compounds addressing induction of cell death are worth investigating. Here, we evaluated effects on cell cycle progression and possible cytotoxic activity of 4-NC in melanoma cell lines as well as human dermal fibroblasts. Inhibitory effects on cell invasion and MMP activity were also investigated. 4-NC showed cytotoxic activity for all melanoma cell lines tested ($IC_{50} = 20\text{--}40\text{ }\mu\text{M}$, 24 h for tumoral cell lines; $IC_{50} = 50\text{ }\mu\text{M}$ for fibroblast cell line) associated with its capacity to induce apoptosis. Furthermore, this is the first time that 4-NC is described as an inhibitor of cell invasiveness, due mainly to a G1 cell cycle arrest and inhibition of MMP-2 activity in melanoma cell lines.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A significant number of novel therapies now released for clinical use are derived from or inspired by natural products. This has been one of the major cornerstones of pharmaceutical drug development (Newman et al., 2003; Balunas and Kinghorn, 2005; Tan et al., 2006; Gordaliza, 2007). The abundant species diversity found in Native Brazilian flora and fauna enable these plants to be a rich source of potentially active therapeutic agents. While these natural products may become essential tools in drug development, many of them still remain to be characterized by chemical-pharmacological studies.

Pothomorphe umbellata (L.) Miq. (Piperaceae) [syn. *Heckeria umbellata* (L.) Kunth., *Piper umbellata* (L.), *Piper hilarianum* Stend.], a plant native to the Brazilian Atlantic Forest has been widely used in Brazilian folk medicine for the treatment of a variety of ailments, most notably skin lesions (Amorim et al., 1988; Hammer and Johns, 1993; de Ferreira-da-Cruz et al., 2000). The root extract of *Pothomorphe umbellata* (*P. umbellata*) has been shown to exert potent antioxidant activity on the skin by delaying the onset as well as reducing the effects of UVB-induced skin photoaging (Ropke

et al., 2002, 2003, 2005). This antioxidant activity of *P. umbellata* has now been attributed to its main compound, 4-nerolidylcatechol (4-NC) (Barros et al., 1996; Desmarchelier et al., 1997; Ropke et al., 2002).

Ropke et al. (2006) have now demonstrated that the crude hydroethanolic root extract of *P. umbellata* also inhibits skin matrix metalloproteinases (MMPs), MMP-2 and MMP-9 *in vitro*. This was further demonstrated *in vivo* in a photoaging experimental model, whereby *P. umbellata* extract modulated extracellular matrix alterations following UVB exposure by inhibiting constitutive MMP-9 activity. The *in vitro* inhibitory pattern of MMP activities induced by 4-NC resembled that of *P. umbellata* extract observed *in vivo*. The authors postulated that the *in vivo* inhibition was a direct result of 4-NC being able to permeate the skin. Another study has described the *P. umbellata* extract-dependent inhibition of corneal MMP-2 and MMP-9, suggesting that this plant may be a candidate for the therapy of alkali-burned corneas (Barros et al., 2007).

MMPs have long been associated with cancer invasion and metastasis. They play a key role in basement-membrane penetration via extracellular matrix (ECM) degradation and intracellular signaling. In particular, MMP-2 and MMP-9 are overexpressed in several types of human cancer such as breast, lung, hepatocarcinoma and notably melanoma (Fassina et al., 2000; Hornebeck et al., 2002; Hofmann et al., 2005; Overall and Kleinfeld, 2006). Cutaneous melanomas are also notorious for their tendency to metastasize. Essential steps in this process are the degradation of basement membranes and remodeling of the extracellular matrix (ECM) by proteolytic enzymes such as the MMPs (Hofmann et al., 2005).

* Corresponding author. Departamento de Análises Clínicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580 Bloco 17, São Paulo – SP CEP 05508-900, Brazil. Tel.: +55 11 3091 3631; fax: +55 11 3813 2197.

E-mail address: silvya@usp.br (S.S. Maria-Engler).

¹ Both authors equally contributed to this work.

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and advanced stages are inevitably resistant to conventional therapeutic agents (Soengas and Lowe, 2003; Hersey, 2006; La Porta, 2007; Lorigan et al., 2008). Despite the multifactorial etiology of melanoma, a decisive role of UV irradiation in combination with a genetic background of fair hair and light skin is generally accepted. In particular, the inability of melanomas to undergo apoptosis in response to chemotherapy and other external stimuli poses a selective advantage for tumor progression, metastasis formation as well as resistance to multiple therapies. (Hersey, 2006; La Porta, 2007).

The induction of apoptosis is not only an important defense against cancer, but also represents a consolidated pathway that can be used as a novel target for cancer therapy. In this regard, many natural products including tea polyphenols, perillyl alcohol, curcumin and quercetin have been shown to induce apoptosis in animal models of chemoprevention (Campbell et al., 2007).

In this work, the cytotoxicity of the 4-NC compound, extracted from the native Brazilian *P. umbellata* plant, was investigated in metastatic melanoma cell lines as well as in primary human dermal fibroblasts. Human melanoma cell lines were originally derived from patients with metastatic melanoma. Fibroblasts were used in order to analyze the cytotoxicity of 4-NC on normal cells. Cell death was assessed by membrane integrity and DNA fragmentation as determined by flow cytometry. Furthermore, the effect of 4-NC on the functional activity of MMPs, including migration and invasion capacity of melanoma cell lines was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. *P. Umbellata* root extract preparation and 4-nerolidylcatechol isolation

4-NC was isolated from the crude *P. umbellata* extract as described elsewhere (Gustafson et al., 1992; Desmarchelier et al., 1997). Briefly, the freeze-dried 1:1 ethanol: water crude extract (10 g) was submitted to a 60 H silica-gel chromatography column (15 mm × 230 mm) and eluted with CHCl_3 (Merck, Darmstadt, Germany) at 23 mL/min in a Buchi flash chromatography liquid system (Switzerland). The presence of 4-NC in the chromatographic fractions was detected by TLC (thin layer chromatography), using previously isolated 4-NC as a standard and dichloromethane: methanol (91:1 v/v) as the mobile phase. The pure 4-NC (100% purity) was isolated by a Shimadzu SCL 10AVP HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with a UV/VIS detector (SPD10A VP-diode array), Class VP software and a Phenomenex Luna C18 (2) column (Torrance, CA) (10 μm , 250 × 10 mm). The mobile phase used was 9:1 MeOH (Merck, Darmstadt, Germany): H_2O with a flow rate of 6.0 mL/min followed by detection at 282 nm. The structure of 4-NC was deduced by nuclear magnetic resonance ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz) and confirmed by comparison of its spectral features with published values (Kijjoo et al., 1980; Ropke et al., 2006).

2.2. Cell cultures

The tumor cell lines used in this work included the metastatic melanomas: SK-Mel-28, -103 and -147, and a primary cell culture of non-malignant dermal fibroblasts. SK-Mel-103 and -147 have wild-type p53 and SK-Mel-28 is mutant for p53 with a point mutation at codon 145 (Bertrand et al., 2007).

All cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, and maintained at 37 °C under 5% CO_2 atmosphere. The pure 4-NC was dissolved in ethanol to a concentration of 10 mM and stored at –20 °C. The

concentration of ethanol in culture never exceeded 0.1%, and exhibited 100% cell viability when used as a control.

2.3. Measurement of cell viability

For the measurement of cell viability, 5×10^4 cells from each cell line were seeded on 24-well plates and after a 24 h attachment period they were treated with 4-NC (10, 20, 30, 40 or 50 μM). Following a 24–48 h incubation period, cell viability was assessed by counting live versus dead cells on a hemocytometer using standard Trypan Blue (0.4% in phosphate-buffered saline, PBS) exclusion staining. The assay was done in quadruplicate. IC_{50} values (i.e., concentration that inhibited cell growth by 50% compared to untreated controls) were obtained by non-linear regression analysis with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

2.4. Analysis of membrane integrity

Cells (2×10^5) were plated on a 24-well plate and following 24 h treatment with 4-NC (30, 40 or 50 μM), 1.5 mL of the cell suspension was centrifuged at 1000 rpm for 5 min at 4 °C. Plasma membrane integrity was assessed as described by de Lima et al. (2007) with minor modifications as following. After 24 h treatment, 50 μL of a propidium iodide (PI; Sigma Chemical, St. Louis, MO) labeling solution (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in saline buffer) was added to 0.5 mL of DMEM containing harvested cells. After 5 min incubation at room temperature, cells were evaluated in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, California, USA) using the Cell Quest software. Fluorescence was measured as described above using the FL2 channel (orange-red fluorescence: 585/42 nm). Ten thousand events were analyzed per experiment and the assay was done in triplicate.

PI, a highly water-soluble fluorescent compound that binds to DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference, cannot pass through intact membranes of live cells. Therefore, high fluorescence indicates compromised membrane integrity following 4-NC treatment.

2.5. DNA fragmentation analyses

Cells were obtained as described above. The pellet was resuspended in 0.3 mL of lysis buffer (0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100) containing 0.02 mg/mL PI. After 30 min incubation at room temperature, the fluorescence was measured by flow cytometry. DNA fragmentation was observed by the presence of particles exhibiting low fluorescence, indicative of cleaved DNA. Intact DNA cannot be intensely bound by PI due to its high condensation and small size. The cells were evaluated in a FACScalibur flow cytometer as described above.

2.6. Phosphatidylserine (PS) externalization

PS externalization was assessed by flow cytometry following PS staining with fluorescein-conjugated Annexin V (Annexin V-FITC) as described by de Lima et al. (2007) with minor modifications. Cells were washed twice with cold PBS and then resuspended in 100 μL binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl_2) at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Five microliters of Annexin V-FITC (1 mg/mL) was added and the cells incubated in the dark for 20 min at room temperature with gentle agitation. This was followed by the addition of 10 μL of PI solution (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 400 μL of binding buffer. The cells were then analyzed by flow cytometry with Annexin V-FITC fluorescence measured in the FL1 channel (green fluorescence: 530/30 nm) and PI in the FL2 channel (orange-red fluorescence: 585/42 nm). Annexin

V, a phospholipid-binding protein, had a high affinity for PS whereas PI was used to distinguish viable from non-viable cells.

2.7. *In vitro* invasion assay

Transwell invasion chambers containing polycarbonate filters (8 μ m, Costar Corp., Cambridge, MA) were coated on the upper surface with Matrigel (Becton–Dickinson, San Jose, CA). Melanoma cells (5×10^4) were suspended in serum-free DMEM and added to the upper chamber. The bottom and upper chamber contained DMEM and 4-NC (0, 10, 20 or 30 μ M). Cells were incubated for 48 h at 37 °C in a CO₂ incubator. Cells on the upper surface of the filter were completely removed by wiping them with a cotton swab. Cells that had invaded through the Matrigel and reached the lower surface of the filter were fixed in 10% formalin, stained with a toluidine blue solution and counted under a light microscope at 200 $\times$ magnification. The mean number of cells in 10 fields was calculated and the assay performed in quadruplicate.

2.8. Gelatin zymography

Gelatin-substrate gel electrophoresis was used to measure metalloproteinase activity as described by da Silva Cardeal et al. (2006) with minor modifications. Cells were seeded onto plates coated either with type-I collagen gel (2.5 mg/mL) or uncoated plastic (control), and maintained in DMEM containing 10% FBS. When cultures reached approximately 80% confluence, the medium was removed and the cells cultured for 48 h in the presence of 4-NC (0, 10, 20 or 30 μ M). The culture medium was collected and clarified by centrifugation twice at 3000 rpm for 5 min at 4 °C. Protein concentration was determined by the Folin method (Lowry et al., 1951). Supernatant protein (25 μ g) from each sample was separated by electrophoresis on a 10% acrylamide gel containing 0.5 mg/mL gelatin for 1 h at 100 Volts. The gel was washed twice with 2.5% Triton X-100 for 15 min at 37 °C, and once with reaction buffer (0.05 M Tris–HCl (pH 8), 5 mM CaCl₂, 5 mM ZnCl₂). The gel was then incubated for 17 h in the same reaction buffer at 37 °C. Gels were stained with Coomassie solution (0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% methanol and 10% acetic acid) for 30 min and destained in 10% methanol–10% acetic acid. Clear zones of gelatin lysis against a blue background indicated the presence of active MMPs. Each lysed zone within a given sample lane was analyzed by scanning densitometry (450 d.p.i. in GS-700, Bio-Rad, Hercules, California). The assay was performed in quadruplicate.

2.9. Statistical analysis

All data is expressed as the mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using Graph Pad InStat software (version 3.01 for Windows XP, Graph Pad Software, San Diego, California). One-way ANOVA with a multiple comparison test (Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test) was used for data analyses. Correlation analyses were used for identifying potentially causal associations between variables. For cytotoxicity experiments, the statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 4 (version 4.00 for Windows 98, Graph Pad Software, San Diego, California) software, and the Two-way ANOVA test was performed for data analyses.

3. Results

3.1. Cytotoxicity induced by 4-NC treatment

To study the effects of 4-NC treatment on tumor cells as well as normal cells, we treated several aggressive metastatic melanoma

cell lines as well as normal fibroblasts with increasing concentrations of 4-NC over a maximum of 48 h. As indicated by Trypan Blue exclusion assays in Fig. 1A–C, 4-NC exerted concentration-dependent cytotoxic effects on all cell lines tested (IC₅₀ = 20–40 μ M following 4-NC treatment for melanoma cell lines and 50 μ M for normal fibroblast cells). There is statically significant cell death difference between melanoma and fibroblast after 4-NC exposure for 24 h ($P < 0.001$) and 48 h ($P < 0.001$).

Depending on the 4-NC concentration, various phenotypical modifications were observed in all melanomas (SK-Mel-28, SK-Mel-103, and SK-Mel-147). 4-NC was well tolerated by human normal fibroblasts (HNF) up to concentrations 10 and 30 μ M and no morphology alterations can be observed (Fig. 1D). Following 24 h treatment with 20 μ M 4-NC, all melanoma cell lines displayed moderate intracellular vacuolization, but this effect is increased in SK-Mel-147. In the other hand, no vacuolization is observed in HNF. At 30 μ M, there was retraction of cytoplasmatic expansion, leading to cells displaying a rounded shape and cytoplasmatic vacuolization is well depicted in Sk-Mel-147. At higher concentrations (50 μ M), there was detachment from the plastic culture dish resulting in cell clusters of variable size, containing increasing numbers of dead cells for both melanoma and fibroblast cells (Fig. 1D).

4-NC cytotoxicity was then evaluated by flow cytometric analysis using propidium iodide to assess cell membrane integrity and DNA fragmentation (Fig. 2). As shown in Fig. 2A, 4-NC induced variable loss of cell membrane integrity at different concentrations in all cell lines, but most notably in SK-Mel-147. At the highest concentrations used, 4-NC was also able to compromise membrane integrity of the normal fibroblast cells.

DNA fragmentation, a classic hallmark of apoptotic cells was further assessed by flow cytometry in Figs. 2B and 3. Increased concentrations of 4-NC induced dose-dependent DNA fragmentation in all cell lines tested (Fig. 2B). Note the higher level of DNA fragmentation shown for melanoma cells compared to fibroblasts at lower concentrations of 4-NC (fibroblasts had higher endogenous fragmented DNA in untreated conditions). At the highest concentration of 4-NC (50 μ M), SK-Mel-28 and -103 presented with the highest percentage of cells containing fragmented DNA (Fig. 3). While these cell lines did not show any signs of ruptured cell membranes (Fig. 2A) at this time and concentration, this was most likely indicative of early activation of an apoptotic death pathway.

As shown in Fig. 1, 4-NC was less toxic to HNF compared to all melanoma cell lines tested. The higher IC₅₀ value (50 μ M) determined for fibroblasts indicates there may be some selective effects of 4-NC for tumor cells over normal cells. At mid-range concentrations (30–40 μ M), the percentage of cells with ruptured membranes and fragmented DNA was also lower for HNF compared to the melanoma cell lines (Fig. 2A and B).

For precise differentiation between cells undergoing necrosis or apoptosis in the 4-NC-mediated cell death, cells were analyzed by flow cytometry using PI and fluorochrome-conjugated Annexin V labeling. Cells undergoing apoptosis undergo changes in the phospholipid bilayers of their cell membranes, including externalization of phosphatidylserine (PS) to the outer plasma membrane in early apoptotic events. On the other hand, membrane integrity is lost only in late stages of apoptosis. Apoptotic cells can therefore be stained with Annexin V-FITC, while PI remains excluded. In contrast, cells undergoing necrosis exhibit both PS exposure on outer membranes and loss of membrane integrity simultaneously, and hence necrotic cells can be stained with both PI and Annexin V-FITC.

Histograms in Fig. 4 represent the results of PS externalization in melanomas following 4-NC treatment. Fig. 4 indicates the vast majority of these melanoma cells stained positive for Annexin V

Fig. 1. Cytotoxic effects of 4-NC on melanoma cell lines (SK-Mel-28, SK-Mel-103 and SK-Mel-147) and normal fibroblasts (HNF). Dose response curves indicate viability of melanoma cell lines following incubation with 4-NC for 24 h (A) or 48 h (B) as assessed by Trypan Blue staining. (C) Approximate IC₅₀ values corresponding to cell viability determined in A and B. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of three separate experiments. There is statically significant cell death difference between melanoma and fibroblast after 4-NC exposure for 24 h ($P < 0.001$) and 48 h ($P < 0.001$). (D) Differential effect of 4-NC in cell morphology is depicted in melanoma cell lines and in human normal fibroblast. 24 h after incubation, cells photographs were taken, and the percentage of cell death was determined by Trypan blue staining. Note the presence of vacuolization in SK-Mel-103 and the increased vacuolization in SK-Mel-147 when cells were treated in 10 and 30 μM . Normal fibroblasts are not showing morphological alterations in a dose-dependent-manner but cell death is well observed in the high cytotoxic dose 50 μM .

upon 4-NC treatment. The high DNA fragmentation, low membrane rupture and high PS externalization observed in these melanomas reflects cell death by apoptosis. Contrary to this data, while SK-Mel-147 presented with ruptured cell membranes and DNA fragmentation, cells stained positive for Annexin V and positive for PI. Therefore, apoptotic patterns were not observed in SK-Mel-147 at this concentration, or at earlier time points such as 6 and 12 h (data not shown).

3.2. Effect of 4-NC on cell cycle distribution

To assess possible changes in cell cycle progression upon 4-NC treatment, flow cytometric analysis was performed following incubation with 30 μM 4-NC after 24 h treatment. As shown in Fig. 5, the presence of 4-NC arrested cells at the G0/G1 phase of the cell cycle in SK-Mel-147 and HNF cell lines ($^{**}P < 0.01$). Other cell lines did not show any significant differences in cell cycle progression

Fig. 2. Percentage of cells with (A) ruptured plasma membranes, and (B) DNA fragmentation following 24 h treatment with increasing concentrations of 4-NC (0, 30, 40 or 50 μM). Results were obtained by flow cytometric analysis of 10,000 events using propidium iodide. Values are presented as the mean $\pm$ SEM from three separate experiments done in triplicate ($P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ compared to the untreated control; $n = 3$).

following treatment with 4-NC at this concentration and time point studied.

3.3. 4-NC reduces the invasive ability of melanoma cell lines through Matrigel

Melanomas are notorious for their tendency to metastasize and essential steps in this process are the degradation of basement

membranes and remodeling of the extracellular matrix (ECM) by proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs). Invasion ability is indicated by the number of cells that migrate through a reconstituted Matrigel layer to the bottom surface of a porous membrane in a Transwell chamber assay. As shown in Fig. 6, all three concentrations of 4-NC treatment (10, 20 and 30 μM) demonstrated a reduction in the number of cells on the bottom surface of the Transwell, indicating a decrease in the invasiveness of the three melanoma cell lines. There was a further significant reduction in cell invasion observed for SK-Mel-103 and -147 ($P < 0.05$) at 20 and 30 μM compared to the control cells (untreated cells).

3.4. Effects of 4-NC treatment on gelatinase activity

The process of invasion and MMP activation are essential events in tumor metastasis, and metastatic melanomas are notoriously aggressive and chemoresistant, with poor patient prognosis (Gaggioli and Sahai, 2007). Gelatin zymography was performed with conditioned medium (24 h) to measure metalloproteinase activity in SK-Mel-147 following 4-NC treatment. As shown in Fig. 7A and B, this technique revealed the presence of two major gelatinolytic activities corresponding to MMP-2 (pro and active form) and MMP-9 as determined by comparison to recombinant enzymes. At 20 μM 4-NC treatment, only the active form of MMP-2 (68 kDa) was observed to have less activity when cells were cultured on collagen type I ($P < 0.05$). At 30 μM treatment there was less activity of active MMP-2 when cultured on both, collagen type I and on plastic, as shown by the absence of clear zones. 4-NC did not alter the activity of pro MMP-2 (72 kDa) or MMP-9 (92 kDa) at any concentration tested.

4. Discussion

The increased incidence of malignant melanoma in the past few decades, its high mortality rate and marked resistance to most therapies, have posed an enormous challenge to the scientific community. Many mechanistic studies have provided explanations for the extraordinarily high chemoresistance of melanoma (i.e. down-regulation of Apaf-1, overexpression of Bcl-2 family members and increases in PI3 K/Akt/mTOR pathway signaling), suggesting new treatment strategies directed at induction of pro-apoptotic responses (Raisova et al., 2000; Braun et al., 2007; Eberle et al.,

Fig. 3. Quantification of DNA fragmentation. Histograms represent analysis of DNA content in SK-Mel-28, SK-Mel-103 and SK-Mel-147 following 24 h treatment with 50 μM of 4-NC. Intact DNA in live cells is depicted by a high fluorescent signal (M2), whereas small pieces of DNA resulting from fragmentation emit low fluorescence (M1). Histograms are representative of three separate experiments done in triplicate.

Fig. 4. 4-NC induction of apoptosis in melanoma cells. Flow cytometric analysis of PS externalization on melanoma cells treated with 4-NC (0 or 50 μ M for 24 h). (A) Dot plots show intensity of Annexin V-FITC fluorescence on the X-axis and PI fluorescence on the Y-axis. (B) Percentage of live cells (Annexin negative/PI negative), apoptotic cells (Annexin positive) and necrotic cells (Annexin positive/PI positive) after analysis by flow cytometry. $P < 0.05$ for comparison of control cells (untreated) to cells treated with 4-NC (50 μ M).

Fig. 5. Effects of 4-NC on cell cycle progression. Following incubation with 4-NC (30 μ M) for 24 h, various cell lines were stained with PI and analyzed for DNA content by flow cytometry. Results were obtained from 10,000 events and presented as the percentage of cells in the G1, S and G2 phases. The values represent the mean $\pm$ SEM of nine determinations from three experiments. $P < 0.05$, $P < 0.01$ compared to the control (untreated) cells. Data is indicative of G0/G1 cell cycle arrest in SK-Mel-147 and HNF cells.

2007; Manning and Cantley, 2007). Furthermore, continual activation of proliferation and survival pathways such as the MAPK pathway, which is activated in almost all stages of melanoma have also contributed to its chemoresistant phenotype. Therefore, suppression of proliferation pathways using various MAPK inhibitors (BRAF-inhibitor Sorafenib; iNOS/Akt3/MAPK signaling inhibitor PBISe) has been a major trend in the treatment of melanoma

(Fecher et al., 2008; Madhunapantula et al., 2008). Despite the use of multiple new therapies either as single agents or in combination, melanoma still remains largely resistant to all experimental agents with no major clinical advances yet forthcoming (Eberle et al., 2007).

Due to its long history as a remedy for various skin ailments, we attempted to analyze potential cytotoxic effects of the recently de-

Fig. 6. Effects of 4-NC on invasion. Melanoma cell lines (SK-Mel-28, SK-Mel-103 and SK-Mel-147) were seeded onto Matrigel coated filters in Boyden chambers. After 24 h of 4-NC treatment (0, 10, 20 or 30 μ M) the number of cells present on the bottom side of the filter was quantified and expressed as a percentage of the control (no treatment) cells. The values are presented as the mean $\pm$ SEM from four experiments performed in triplicate. $P < 0.05$ compared to the control.

scribed 4-NC compound, originating from the native Brazilian *P. umbellata* species, on various melanoma cell lines. In this study, we describe a 4-NC-dependent induction of apoptosis in melanoma cell lines as well as inhibition of invasiveness. The tumor cells lines studied here have been broadly used as models of chemoresistant melanoma in the literature.

Soengas et al. (2001) have previously shown that among a panel of 19 melanoma lines, SK-Mel-103 and -147 grow most aggressively in immunosuppressed mice. These cell lines are also among the most chemoresistant, expressing low levels of Apaf-1 and high levels of antiapoptotic factors such as Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 or Survivin. In addition to key mediators of apoptosis, the authors investigated genes playing critical roles in cell cycle regulation and arrest,

such as the tumor suppressor p53, p14ARF and p16INK4a. SK-Mel-147 has been reported as bearing p16INK4a mutations R58Stop or P114L; this cell line has in addition a homozygous deletion of exon 1 β of p14ARF. The SK-Mel-28 cell line is mutant for p53 and has an R24C mutation in CDK4.

As shown in Fig. 1, 4-NC was cytotoxic to the melanomas studied (SK-Mel-28, SK-Mel-103 and SK-Mel-147). Interestingly, our results indicated that 4-NC was less toxic to normal human fibroblasts considering the cell death rate (Figs. 1 and 2).

Cell death as a consequence of apoptosis or necrosis has long been considered to be a result of two distinct mechanisms, with different biochemical, morphological and functional characteristics. However, recently it has become widely accepted that apoptosis and necrosis may not necessarily be independent pathways, but may rather share some common events, at least in some signal transduction pathways and in the early phases of the cell death process (Jun et al., 2007). In the presence of a high concentration of 4-NC (50 μ M), necrotic death was induced in SK-Mel-147 and HNF cells as determined by flow cytometric methods (Fig. 2A and B). Contrary to this finding, there was an induction of apoptosis in melanoma cell lines SK-Mel-28 and SK-Mel-103 at the time and concentration studied. These melanoma lines presented with a high percentage of cells containing fragmented DNA, with no loss of membrane integrity and PS externalization, characteristic of apoptotic cell death. One hypothesis is that the differences among the cell lines may be explained solely by varying sensitivities of the cell lines to 4-NC, reflected by disparate death time-courses and activation of different death pathways. At high concentrations, it is possible that there was some overlap of apoptotic and necrotic signaling pathways seen in SK-Mel-147, while SK-Mel-103 and SK-Mel-28 were able to activate apoptotic pathways only.

Interestingly, the aggressive SK-Mel-28 and -103 cell lines known to express low levels of Apaf-1 and high levels of antiapoptotic factors such as Bcl-2 and Bcl-xL were sensitive to 4-NC

Fig. 7. Effect of 4-NC on gelatinase activity. (A) Gelatin zymography of SK-Mel-147 cells incubated for 24 h in the absence (0P and 0C) and presence of 20 μ M or 30 μ M 4-NC. Note that only the active MMP-2 (68 kD) was inhibited in the presence of 4-NC as shown by the absence of clear zones. This compound did not alter the activity of proMMP-2 (72 kD) and MMP-9 (92 kD) at any concentration. P = cultured on plastic; C = culture on collagen type I; S = molecular weight standard; R = recombinant MMP-2 and MMP-9. (B) Histograms represent the percentage of active MMP-2 in the absence (0P and 0C) and presence of 10, 20 or 30 μ M 4-NC compared to controls (no treatment). $P < 0.05$ compared with the control. Histograms are representative of three separate experiments done in triplicate.

reflected by the induction of apoptosis (Ahmann et al., 1976; Fernández et al., 2005). The potential for apoptosis induction by 4-NC in typically chemoresistant metastatic melanoma lines described here definitely warrants further study with this compound, including possible studies in xenograft tumor models to determine efficacy *in vivo*.

Our results also indicated that 4-NC was capable of inducing growth arrest at the G1 phase of the cell cycle in some of cell lines studied. As shown in Fig. 4, the lower IC₅₀ concentration of 30 µM caused a G1 growth arrest in SK-Mel-147 and HNF cells.

Since 4-NC was able to induce growth arrest, we further performed senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) assays to assess whether this 4-NC-induced arrest was in fact premature senescence. Premature senescence is emerging as a key mechanism of tumor suppression, particularly in light of recent studies demonstrating the existence of senescent cells in lymphoma, melanoma, breast and lung adenomas, among other premalignant tumors *in vivo* (Braig et al., 2005; Campisi, 2005; Collado et al., 2005; Narita and Lowe, 2005; Denoyelle et al., 2006; Sarkisian et al., 2007). However, the observed growth arrest resulting from 4-NC treatment was not indicative of irreversible senescence as determined by the absence of blue SA-β-Gal staining in melanoma cells (data not shown). Therefore, we found that 4-NC itself was not effective as a senescence inducer in melanomas.

Previously, the 4-NC compound and *P. umbellata* extract have been shown to demonstrate inhibitory effects on matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in a skin photoaging model (Ropke et al., 2006). Furthermore, the ethanolic crude extract of *P. umbellata* has been shown to inhibit MMP-2, pro-MMP-2 and MMP-9 in a dose-dependent manner in normal corneas and in corneas after alkali injury (Barros et al., 2007). Our results depicting the 4-NC-dependent inhibition of MMP-2 in melanoma lines (shown in Fig. 7) also validates this previously published data.

Pathways of cell invasion and metastasis are critical targets for therapeutic treatment of malignant solid tumors. MMP-2 and MMP-9 have been found to be tumor-cell-associated proteinases and their expression and activity against matrix macromolecules have been linked to the development of malignant phenotypes and have shown to overbalance their endogenous inhibitors (Donà et al., 2004; Correa et al., 2006; Kang et al., 2008; Sun et al., 2007). Increased expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 was shown to correlate with an invasive phenotype using different matrix degradation assays. In particular, increased expression of active MMP-2 has been associated with melanoma progression (Hofmann et al., 2005).

Several pharmaceutical companies are now currently developing low-molecular weight MMP inhibitors for clinical purposes (Watson et al., 1995; Hofmann et al., 2005). Consequently, inhibitors of MMPs represent an attractive target for a new class of anti-cancer agents. Regarding this aspects, 4-NC seems to combine those characteristics as a cytotoxic agent and inhibitor effects on MMPs in present model.

In conclusion, this is the first study addressing the effects of the 4-NC compound isolated from the native Brazilian species *P. umbellata* on melanoma tumor cells. Our results demonstrate that 4-NC is a melanoma cytotoxic compound. This cytotoxicity was associated with its capacity to induce apoptosis, most likely following a G1 cell cycle arrest besides the inhibitory effect on invasiveness via decreased MMP-2 activity in melanoma cell lines.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest. The signed Conflict of Interest Policy Forms are above.

Acknowledgements

We are especially grateful to Dr. María S. Soengas (CNIO, Madrid, Spain) and Dr. Alexander L. Jorge (School of Medicine, University of São Paulo) for generously providing the cell lines used in this work. This studied was supported by FAPESP, CNPq, CAPES and PRP-USP.

References

- Ahmann, D.L., Bisel, H.F., Edmonson, J.H., 1976. Clinical comparison of adriamycin and a combination of methyl-CCNU and imidazole carboxamide in disseminated malignant melanoma. *Clin. Pharmacol. Ther.* 19, 821–824.
- Amorim, C.Z., Flores, C.A., Gomes, B.E., Marques, A.D., Cordeiro, R.S., 1988. Screening for antimalarial activity in the genus *Potomorphe*. *J. Ethnopharmacol.* 24, 101–106.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431–441.
- Barros, S.B.M., Teixeira, D.S., Aznar, A.E., Moreira Jr., J.A., Ishii, I., Freitas, P.C.D., 1996. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Potomorphe umbellata* L. *Miq. Ciência e Cultura* 48, 114–116.
- Barros, L.F., Barros, P.S., Ropke, C.D., Silva, V.V., Sawada, T.C., Barros, S.B., Belfort Jr., R., 2007. Dose-dependent *in vitro* inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *Potomorphe umbellata* after alkali injury. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 1129–1132.
- Bertrand, Y., Demeule, M., Michaud-Levesque, J., Béliveau, R., 2007. Melanotransferrin induces human melanoma SK-Mel-28 cell invasion *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 418–423.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., Schmitt, C.A., 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660–665.
- Braun, F.K., Fecker, L.F., Schwarz, C., Walden, P., Assaf, C., Durkop, H., Sterry, W., Eberle, J., 2007. Blockade of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincides with distinct apoptosis resistance in cutaneous T-cell lymphoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2425–2437.
- Campbell, C.T., Prince, M., Landry, G.M., Kha, V., Kleiner, H.E., 2007. Pro-apoptotic effects of 1'-acetoxychavicol acetate in human breast carcinoma cells. *Toxicol Lett.* 28, 151–160.
- Campisi, J., 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513–522.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., Beach, D., Serrano, M., 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Correa, T.C., Brohem, C.A., Winnischofer, S.M., a Cardeal, L.B., Sasahara, R.M., Taboga, S.R., Sogayar, M.C., Maria-Engler, S.S., 2006. Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. *J. Cell Biochem.* 99, 156–167.
- da Silva Cardeal, L.B., Brohem, C.A., Corrêa, T.C., Winnischofer, S.M., Nakano, F., Boccardo, E., Villa, L.L., Sogayar, M.C., Maria-Engler, S.S., 2006. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem. Cell Biol.* 84, 713–719.
- de Ferreira-da-Cruz, M., Adami, Y.L., da Espinola-Mendes, E., Figueiredo, M.R., Daniel-Ribeiro, C.T., 2000. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiparasmodial activity in the *Potomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. *Exp. Parasitol.* 94, 243–247.
- de Lima, T.M., Amarante-Mendes, G.P., Curi, R., 2007. Docosahexaenoic acid enhances the toxic effect of imatinib on Bcr-Abl expressing HL-60 cells. *Toxicol In Vitro* 21, 1678–1685.
- Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., Pointer, J.N., Gruber, S.B., Su, L.D., Nikiforov, M.A., Kaufman, R.J., Bastian, B.C., Soengas, M.S., 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol.* 8, 1053–1063.
- Desmarchelier, C., Barros, S., Repetto, M., Latorre, L.R., Kato, M., Coussio, J., Ciccio, G., 1997. 4-Nerolidylcatechol from *Potomorphe* spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. *Planta Med* 63, 561–563.
- Donà, M., Dell'Aica, I., Pezzato, E., Sartor, L., Calabrese, F., Della Barbera, M., Donella-Deana, A., Appendino, G., Borsarini, A., Caniato, R., Garbisa, S., 2004. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 64, 6225–6232.
- Eberle, J., Kurbatov, B.M., Hossini, A.M., Trefzer, U., Fecker, L.F., 2007. Overcoming apoptosis deficiency of melanoma—hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist. Updat.* 10, 218–234.
- Fassina, G., Ferrari, N., Brigati, C., Benelli, R., Santi, L., Noonan, D.M., Albini, A., 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. *Clin. Exp. Metastasis* 18, 111–120.
- Fecher, L.A., Amaravadi, R.K., Flaherty, K.T., 2008. The MAPK pathway in melanoma. *Curr. Opin. Oncol. Mar.*, 20183–20189.
- Fernández, Y., Verhaegen, M., Miller, T.P., Rush, J.L., Steiner, P., Opipari Jr., A.W., Lowe, S.W., Soengas, M.S., 2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res.* 65 (14), 6294–6304.

- Gaggioli, C., Sahai, E., 2007. Melanoma invasion – current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* 20, 161–172.
- Gordaliza, M., 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 767–776.
- Gustafson, Kirk R., Cardellina II, John H., McMahon, James B., Pannell, Lewis K., Cragg, Gordon M., Boyd, Michael R., 1992. HIV inhibitory natural products. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. *J. Org. Chem.* 57, 2809–2811.
- Hammer, M.L., Johns, E.A., 1993. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). *J. Ethnopharmacol.* 40, 53–75.
- Hersey, P., 2006. Apoptosis and melanoma: how new insights are effecting the development of new therapies for melanoma. *Curr Opin Oncol.* 18, 189–196.
- Hofmann, U.B., Houben, R., Bröcker, E.B., Becker, J.C., 2005. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie.* 87, 307–314.
- Hornebeck, W., Emonard, H., Monboisse, J.C., Bellon, G., 2002. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 12, 231–241.
- Jun, D.J., Kim, J., Jung, S.Y., Song, R., Noh, J.H., Park, Y.S., Ryu, S.H., Kim, J.H., Kong, Y.Y., Chung, J.M., Kim, K.T., 2007. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 28, 37350–37358.
- Kang, J.H., Han, I.H., Sung, M.K., Yoo, H., Kim, Y.G., Kim, J.S., Kawada, T., Yu, R., 2008. Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP- 2. *Cancer Lett.* 8 (261), 84–92.
- Kijjoa, A., Giesbrecht, A.M., Akisue, M.K., Gottlieb, O.R., Gottlieb, H.E., 1980. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Med.* 39, 85–87.
- La Porta, C.A., 2007. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr. Med. Chem.* 4, 387–391.
- Lorigan, P., Eisen, T., Hauschild, A., 2008. Systemic therapy for metastatic malignant melanoma—from deeply disappointing to bright future? *Exp. Dermatol.* 17, 383–394.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Madhunapantula, S.V., Desai, D., Sharma, A., Huh, S.J., Amin, S., Robertson, G.P., 2008. PBISe, a novel selenium-containing drug for the treatment of malignant melanoma. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1297–1308.
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Narita, M., Lowe, S.W., 2005. Senescence comes of age. *Nat. Med.* 11, 920–922.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.* 66, 1022–1037.
- Overall, C.M., Kleinfeld, O., 2006. Tumour microenvironment – opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 6, 227–239 (Review).
- Raisova, M., Bektas, M., Wieder, T., Daniel, P., Eberle, J., Orfanos, C.E., Geilen, C.C., 2000. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramidemediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett.* 473, 27–32.
- Ropke, C.D., Kaneko, T.M., Rodrigues, R.M., da Silva, V.V., Barros, S., Sawada, T.C., Kato, M.J., Barros, S.B., 2002. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *Int. J. Pharm.* 249, 109–116.
- Ropke, C.D., Meirelles, R.R., da Silva, V.V., Sawada, T.C.H., Barros, S.B.M., 2003. *Pothomorphe umbellata* extract prevents -tocopherol from depletion after UV-irradiation. *Photochem. Photobiol.* 78, 436–439.
- Ropke, C.D., Sawada, T.C., Silva, V.V., Michalany, N.S., Barros, S.B.M., 2005. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 272–276.
- Ropke, C.D., da Silva, V.V., Kera, C.Z., Miranda, D.V., de Almeida, R.L., Sawada, T.C., Barros, S.B., 2006. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. *Photochem. Photobiol.* 82, 439–442.
- Sarkisian, C.J., Keister, B.A., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Moody, S.E., Chodosh, L.A., 2007. Dose-dependent oncogene-induced senescence *in vivo* and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 493–505.
- Soengas, M.S., Capodieci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207–211.
- Soengas, M.S., Lowe, S.W., 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138–3151.
- Sun, B., Zhang, S., Zhang, D., Gu, Y., Zhang, W., Zhao, X., 2007. The influence of different microenvironments on melanoma invasiveness and microcirculation patterns: an animal experiment study in the mouse model. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133, 979–985.
- Tan, G., Gyllenhaal, C., Soejarto, D.D., 2006. Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Curr. Drug Targets* 7, 265–277.
- Watson, S.A., Morris, T.M., Robinson, G., Crimmin, M.J., Brown, P.D., Hardcastle, J.D., 1995. Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models. *Cancer Res.* 55, 3629–3633.

RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion

**Tatiana C. Silveira Corrêa ^{1a},
Renato Ramos Massaro ^{1a},
Carla Abdo Brohem ¹,
Sebastião Roberto Taboga²,
Marcelo Lazzaron Lamers³
Marinilce Fagundes dos Santos³
Silvia Stuchi Maria-Engler ^{1*}.**

^aBoth authors equally contributed to this work.

***Corresponding Author: silvia@usp.br**

¹Department of Clinical Chemistry & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil;

²Department of Biology, IBILCE—University State of São Paulo, São José do Rio Preto, Brazil;

³Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil;

Key words: glioblastoma, RECK gene, cytoskeleton, invasion, migration, MMP

Acknowledgements: The authors gratefully acknowledge funding support from FAPESP (Project Grant No. 06/50915-1 and Tatiana C. S. Corrêa's Fellowship 05/51194-3), CNPq, CAPES and PRP-USP. We are also thankful for Drs. Silvia Berlanga de Moares Barros, Mari Cleide Sogayar and Chiaki Takahashi for reagents and discussion.

Abstract

RECK is an important tumor suppressor gene in which anti-tumoral activity has traditionally been associated to its inhibitory effects on MMPs, regulating at least MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP. Elevated MMP activity due to lack of functional RECK compromises tissue integrity. RECK levels have been shown to be decreased in progression of glioblastoma from less invasive grade II gliomas to very invasive human glioblastoma multiforms (GBMs). Due to the inverse correlation between RECK expression and glioma invasiveness, we hypothesized that RECK expression would compromise the invasive behavior of these gliomas. We therefore conducted this study to explore forced RECK expression in the highly invasive T98G human GBM cell line, which displays high levels of both MMP-2 and -9. Expression levels as well as protein levels of RECK, MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP were assessed by qPCR and immunoblotting in T98G/RECK+ cells (stable transfection of T98G overexpressing RECK). The invasion and migration capacity of this GBM cell line expressing high levels of RECK was shown to be inhibited in transwell and wound assays. Dramatic cytoskeleton modifications were observed in the T98G/RECK+ cells, when compared to control cells, such as the abundance of stress fibers (contractile actin-myosin II bundles) and reduction of lamellipodia. T98G/RECK+ cells also displayed phosphorylated focal adhesion kinase (P-FAK) in mature focal adhesions associated with stress fibers; whereas P-FAK in control cells was mostly associated with immature focal complexes. Interestingly, the RECK protein was predominantly localized to the leading edge of migrating cells, associated with membrane ruffles. Surprisingly, in this glioma model, the overexpression of RECK had no detectable effects on MMP-2 and -9 as predicted; no alterations were observed at the mRNA level (qPCR), at the protein level (immunoblotting) nor in protein activity (gelatin zymography). Unexpectedly, introduced expression of RECK effectively inhibited the invasive process through rearrangement of actin filaments, promoting a decrease in migratory ability. This work has associated RECK tumor suppressor activity with the inhibition of motility and invasion in this GBM model, which are two glioma characteristics responsible for the inefficiency of current available treatments.

Introduction

Gliomas are the most common primary brain tumor in adults and among them, glioblastoma multiforme (GBM), the more aggressive type, shows the higher incidence. Gliomas display high vascularization, aggressive growth, and invasion into surrounding brain tissue, often remaining refractory to therapy (1). Because gliomas rapidly grow and invade the surrounding brain parenchyma, it is often impossible to achieve complete surgical resection without causing severe neurologic damage (2). While individual glioma cells migrate into the surrounding brain parenchyma, other cancers metastatic to this site do not intermingle with host cells and grow as circumscribed destructive masses. Invasiveness is probably the greatest barrier to glioma treatment, since its diffuse infiltration is also the basis of surgical treatment failure.

The process of tumor cell invasion into the stromal tissue is closely related to interactions between the tumor cells and the extracellular matrix (ECM). Altered expression and modification of ECM proteins in tumor cells plays a significant role in their invasion into surrounding normal tissue (3). The matrix metalloproteinase (MMP) family has long been associated with cancer invasion and metastasis owing to its ability to degrade the ECM (4). Among the MMPs, upregulation of gelatinases, MMP-2 and MMP-9, has shown a strong correlation with glioma progression (5). Hence, the development of novel invasion inhibitors along with anti-proliferative therapies may contribute to the control of local tumor growth as well as tumor spread.

Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (*RECK*) was first identified as a cDNA clone inducing morphological reversion ('flat reversion') in NIH3T3 cells transformed by the *v-K-ras* oncogene. RECK has been shown to inhibit MMP activity through several mechanisms, including direct inhibition of protease activity, regulation of cellular release as well as possible sequestration at the cell surface (6). RECK inhibits the activity of at least three MMP members, including MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP (7). Recently, Takagi and co-authors (8) described for the first time that RECK is also able to regulate MMP-9 at gene

expression level, not only post transcriptionally, as broadly described before for many tumor types. Due to its role in regulation of various ECM proteins, accumulating evidence has now suggested that the altered expression of RECK plays a role in various human disorders, such as rheumatoid arthritis (9) and asthma (10). Other functions have recently been attributed to differential expression of RECK on processes such as angiogenesis (11, 12), chondrogenesis (13), and myogenesis (14).

Our previous data has shown higher *RECK* mRNA expression in non-invasive glioma cells, when compared to invasive T98G cells in samples obtained from cultures where the invasive process was fully established; while MMPs-2 and -9 displayed the opposite pattern: higher levels of expression and activity in T98G cells when compared to non-invasive cell line (15). In glioma progression, from less invasive grade II gliomas to highly invasive GBMs, *RECK* mRNA level decreases (16). This inverse correlation between *RECK* expression and glioma invasiveness conducted to this study to explore *RECK* forced expression in T98G invasive human glioma cell line, hypothesizing that *RECK* would compromise the invasive behavior. Interestingly, this effect is not associated with MMP modulation, as has previously been described to RECK function, but rather we reveal a novel role of RECK in cytoskeleton rearrangement that impairs cell motility and hence partially prevents tumor invasion. Furthermore, we present here for the first time, that *RECK* overexpression effectively decreases cell motility and invasion, through actin cytoskeleton rearrangements and stabilization of focal adhesions.

These studies suggest that *RECK* may be a suitable target in the development of new strategies for glioma treatment.

Material and Methods

Cell culture

The human glioma T98G cells, derived from a glioblastoma, were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were grown in

Dulbecco's modified Eagle's minimum essential (DMEM) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin and maintained at 37°C in 5% CO² humidified atmosphere.

Overexpression of RECK in T98G cells

The mammalian expression vector pCXN2-hRECK, used to overexpress the *RECK* gene (17), was a kind donation from Dr. Makoto Noda's laboratory. T98G cells were transfected with either pCXN2-hRECK or pCXN2 (control vector), using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Cells were selected in media containing 1 mg/mL of G418. G418-resistant colonies were cloned and expanded. Eleven G418-resistant cell colonies were screened for the expression of *RECK* by real time PCR, immunoblotting and immunohistochemistry.

Real time PCR

Total RNA was isolated from cells using TRIzol Reagent (Invitrogen). One microgram of total RNA was used to assess relative levels of mRNA using Syber-Green quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (Applied Biosystems) and normalized to tubulin mRNA. Relative expression was calculated using the DDCT method (18). All qRT-PCR reactions were performed in triplicates and the data are presented as the mean +/- SD. The following primers used for qRT-PCR were designed using Primer3 Software.

h-Tubulin

F: 5'TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG;

R: 5'AGTGCCAGTGCGAACTTCATC;

h-RECK

F: 5'TGCAAGCAGGCATCTTCAAA;

R: 5'ACCGAGCCCATTTCATTTCTG;

h-MMP-2

F:5'AGCTCCCGGAAAAGATTGATG3

R:5'CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT3

h-MMP-9

F: 5'GAGGTGGACCGGATGTTCC3'

R:5'AACTCACGCGCCAGTAGAAG3'

h-MMP-14 (MT1-MMP)

F:5'GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA3

R:5'TCGAACATTGGCCTTGATCTC3'

h-TIMP-2

F:5'CGACATTTATGGCAACCCTATCA 3'

R:5'GGGCCGTGTAGATAAACTCTATATCC 3'

Immunocytochemical staining

For actin, tubulin and RECK fluorescent staining, migrating cells of a scratch assay were fixed and permeabilized with 3.7% paraformaldehyde/0.2% Triton X-100 at room temperature for 15 min, in PEM buffer (10mM Pipes; 5mM EGTA; 2mM MgCl₂) at room temperature. For phosphorylated FAK staining, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and permeabilized with 0.2% Triton-X-100 for 5 minutes, followed by several washes with PBS. Blocking of non specific binding sites was carried out in 10% non immune goat serum in PBS for 1 hour at room temperature. Primary antibodies were diluted in 0.2% triton-X-100 in PBS and incubated at 4°C overnight. Dilutions employed were 1:50 for RECK (BD Biosciences Pharmingen), 1:50 for phospho-FAK (Chemicon International Inc., Temecula, CA) and 1:100 for β -tubulin (Chemicon). After washing with PBS, alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG (1:200) were used for staining (Invitrogen). Rhodamine-phalloidin (Invitrogen) was employed for F-actin staining, according to the manufacturer's instructions. Samples were imaged with a Nikon LSM 2000 Laser Scanning Confocal microscope. No changes in brightness or contrast were applied to the pictures.

Scratch assay

Scratch assays were performed as described by Liang (19). Briefly, cells were seeded in 24-well plates and upon reaching complete confluence, a scratch was made through the culture dish using a P200 tip. Cells were washed twice with PBS before their subsequent incubation with culture medium. After 24 hours the scratches were analyzed for cell motility.

***In vitro* invasion and motility assay**

In vitro invasion assays were performed as previously described (20). A 24-well Boyden chamber (8 μ m pore size, Becton Dickinson) was coated with 20 μ L of Matrigel (BD, diluted 1:6 in serum-free medium) and 200 μ L of a 10^5 cell suspension in serum-free DMEM was added to the inner compartment of the chamber. Medium supplemented with 10% serum was added to the outer cup. After 24 hours, cells that had migrated through the Matrigel were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS, stained with 2% toluidine blue and counted under a light microscope. Each experiment was performed in triplicate. Cell motility assays were performed in a similar manner, except that the 8 μ m pore membrane was not coated with Matrigel and the incubation time was reduced to 12 hours.

Gelatin Zymography

MMP-2 and MMP-9 enzymatic activities were assayed by gelatin zymography. Approximately 10^5 cells were seeded in 24-well plates and upon reaching 80% confluence, cells were incubated with serum-free media for 48 hours. Cultured supernatants were collected and protein concentrations determined by the Lowry method. Twenty-five μ g of protein were resolved in 8% SDS acrylamide gels containing 1 mg/mL gelatin. Following electrophoresis, gels were incubated in 0.05 M Tris pH 8, 5 mM CaCl_2 and 5 μ M ZnCl_2 overnight at 37°C. Gels were then stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.5% in 10% methanol + 10% acetic acid in water) for 30 min, and destained in the same solution in the absence of dye.

Immunoblotting

Adherent cells were collected by trypsinization and lysed by a standard procedure using RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma). Protein concentrations of total cell lysates were measured using the Bradford method and 50 µg of total cell lysate was resolved by electrophoresis on (sodium dodecyl sulfate) SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond GEHealthcare) followed by detection and visualization with ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare). Immunoblotting was performed with the following primary antibodies: mouse anti-RECK (1:250; BD Biosciences Pharmingen), mouse anti-MMP-2, (1:1,500; Chemicon International, Inc.), mouse anti-MMP-9 (1:100; Chemicon International, Inc.), mouse anti-MMP-14 (1:400; Chemicon International, Inc.) and mouse anti-tubulin (1:5,000; Sigma). Secondary antibodies used were goat anti-rabbit IgG (Chemicon) and goat anti-mouse IgG (KPL Laboratories, Maryland, USA) both at a dilution of 1:1000.

Electron Transmission Microscopy

For light microscopy, cultures maintained on collagen gels for 7 days were immediately fixed in Karnovsky fixative (0.1 M Sörensen phosphate buffer, pH 7.2, containing 5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde). Fixed samples were dehydrated in a grade series of ethanol and embedded in paraffin (Histosec, Merck) or glycol methacrylate resin (Leica historesin embedding kit). Sections (3 µm-thick) were stained with hematoxylin–eosin for general studies. These sections were visualized under either a Zeiss Jenaival or an Olympus light microscope. Tissue fragments were fixed by immersion in 3% glutaraldehyde and 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer, pH 7.3, containing 0.54% glucose, for 24 h. After washing with the same buffer, the tissue was post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h, washed, dehydrated in graded acetone series, and embedded in Araldite. Ultrathin silver sections were cut using a diamond knife and contrasted with 2% alcoholic uranyl acetate followed by 2% lead citrate in 1N sodium hydroxide for 10 min. The grids were examined under a Leo-906 transmission electron microscope operating at 80 kV.

Soft agar colony formation

In a 6-well tissue culture plate, a 1.5 mL base layer of 0.6% (w/v) agarose was prepared by adding autoclaved 1.2% (w/v) agarose solution to 2x DMEM medium supplemented with 20% FCS in a 1:1 ratio. The volume of the cell suspension was adjusted to achieve a cell concentration of 2.5×10^6 cells/mL with pre-warmed cell culture medium. A cell suspension containing 3×10^3 cells/ml was prepared in a 1:1 mixture of 0.6% (w/v) agarose solution and 2x DMEM supplemented with 20% FCS. Cell suspension 1 mL was added to the top of the base layer, allowed to solidify, and the plate was incubated overnight at 37°C/ 5% CO₂. After 30 days of culture, colonies were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS and stained with 0.5% crystal violet. The number of colonies was determined using a stereomicroscope.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean $\pm$ SD (standard deviation). Statistical analysis was carried out with the Graph Pad InStat software (version 3.01 for Windows 95, Graph Pad Software, San Diego, CA). One-way ANOVA with a multiple comparison test (Tukey test) was used for data analysis. Statistical significance was defined by a $P < 0.05$.

Results

1. Overexpression of RECK in T98G glioma cells

Following transfection of T98G glioma cells with the vector pCXN2 with or without *h-RECK* we confirmed RECK overexpression by immunocytochemical staining (data not shown) and western blot analyses. *RECK* stable expression was also confirmed in whole cell lysates by both qPCR and western blot analyses while RECK protein was not detectable in wild-type T98G and mock glioma cells (Figure 1A, B). A band of correct size corresponding to the overexpressed RECK protein was observed in the positive clone, while it was absent in parental and mock cell lysates (Figure 1B).

2. Effects of forced RECK overexpression on MMPs

The forced increase in RECK expression did not alter MMP-2 and -14 gene expression and slightly decreased MMP-9, as shown by qRT-PCR (Figure 1A). Furthermore, neither protein levels nor activity (Figure 1B and C) were altered upon RECK overexpression. No effects were detected in the protein levels or in the activity evaluation, evidencing that the role of the studied MMPs in the positive clone is similar to that in the control cells (Figure 1B and C).

3. Role of RECK in inhibition of cell invasion and motility

Considering invasion as an important hallmark of gliomas, assays were performed in order to investigate whether *RECK* expression alters the invasive properties of glioma cells. Our *in vitro* invasion model used Matrigel-coated membranes to assess the number of invading glioma cells. In fact, a considerable decrease in the number of invading RECK+ cells (60%) was observed when compared to T98G wild-type and mock cells (Figure 2A, left panels and 2B black bars). In order to verify the involvement of MMPs on the invasive process, this assay was also performed in the presence of Ilomastat (GM 6001), a synthetic MMP inhibitor, and specific to MMPs including MMP-2 and 9 which are often associated with tumor progression (21). The results indicate that the presence of this MMP inhibitor produced a decrease in the invasion of control cells (parental and mock cells) but had little effect on the RECK+ cells (Fig 2A, right panels and 2B, gray bars). This data provides supportive evidence that invasion of RECK+ cells occurs independently of MMP activity, since GM 6001- induced MMP inhibition had no further effects on invading RECK+ cells, which was already minimal.

These results led us to assess other events that might influence tumor invasion, such as cellular motility. This was assessed by both a scratch assay as well as a transwell motility assay. The scratch-wound assay measures the *in vitro* migration of individual cells at the leading edge of an inflicted scratch through a culture monolayer. As shown in Figure 3A, control cells were able to cover the

open space left from the scratch in 24 hours, whereas migration of RECK+ cells was significantly impaired, leaving an exposed area through the cellular monolayer. Effects of RECK overexpression on glioma cell migration were then quantified using a transwell assay; again RECK forced expression resulted in a remarkable inhibition of glioma cell migration (Fig 3B). This data supports the concept that RECK expression in glioma cells affects not only the invasive capacity of these tumor cells, but tumor cell motility as well.

4. RECK effects on the cytoskeleton and phospho-FAK distribution

Histochemical staining of polymerized actin with rhodamine phalloidin and the immunocytochemical staining of tubulin to visualize microtubules showed profound differences between control (T98G and Mock, Fig. 4A-C; D-F, respectively) and RECK+ migrating cells (Fig. 4G-I). Control cells were evidently polarized in the direction of the movement, and large motility-associated processes such as lamellipodia were observed, containing both actin and microtubules. The cells also presented stress fibers, which are contractile bundles of actin-myosin II, important for the progression of the cell body forward. RECK+ cells, on the other hand, showed few lamellipodia and a great amount of stress fibers traversing the cell body. Those cells were closely packed together, and microtubules were present mostly in the cell body, probably close to the centrosome.

The distribution of phosphorylated FAK was also affected by RECK forced expression. While control cells showed the presence of phospho-FAK mostly in immature focal complexes located in lamellipodia and membrane ruffles, RECK+ cells showed accumulation of phospho-FAK in mature focal contacts, where stress fibers were inserted (Fig. 5, arrows).

5. RECK distribution in migrating cells

RECK immunocytochemical localization showed the presence of the protein almost exclusively in lamellipodia, at the leading edge, mostly in areas of membrane ruffling in RECK+ cells (Fig. 6 H-I). We imaged a few RECK+ cells

presenting lamellipodia, just to show that those cells had higher RECK protein levels than control cells. The distribution pattern, however, was not altered by RECK overexpression.

6. Cell electron microscopy

Our previous data show that cells onto collagen gel showed a well established invasive process after 7 days of culture (15). In order to evaluate *RECK* impact on cell structure during the invasive process we performed electron microscopy analyses. Figure 7 A-C displays actin cytoskeleton in migrating cells in monolayer; while figure 7 D-F depicted that T98G and mock cells showing membrane blebbing around collagen, engulfing part of the fibrils indicating a more invasive capacity (Figure 7D and E). The cell membrane surface that has contact with the collagen is notably different in RECK+ cells. Conversely, RECK+ cells exhibit a smooth contact surface between the cell membrane and the collagen gel, with no evidence of degradation or invasion through the collagen (Figure 7F). Control cells show higher migrating and invading capacities when compared to RECK+ cells.

Soft agar colony formation

Since the tumor stem-cells are considered the most relevant cell type in the development of metastases and recurrences due to their ability to divide and to form colonies in a semisolid matrix (agar or methylcellulose; 22), we can correlate the capacity to form colonies as an indicative of tumoral grade. From transplantable tumors in rat and mice, harvested cells can be cultured directly and quantitatively in vitro to produce clones and provide information on the effectiveness of tumor development in vivo (23). After 30 days in culture, RECK+ cells formed remarkable less colonies than control cells which display smaller diameter (Fig. 8).

Discussion

RECK and MMPs

Brain tumor invasiveness which involves tumor cell-ECM interactions, as well as tumor cell-normal astrocyte interactions (24; 25) will probably compromise novel glioma therapeutic approaches. The ability of this malignant glioma to spread very fast has been associated with MMP activity (25, 26). A number of proteases have been implicated, but most studies have focused on MMP-2 and MMP-9. Expression of these proteases has been shown to increase with glioma grade, and interference with the function of these proteases *in vitro* results in decreased invasive and/or migratory properties (24).

RECK was initially identified as a transformation suppressor gene, and its function was correlated with inhibition of MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP (27, 28; 29).

RECK is normally expressed in adult human tissues and it is downregulated in many solid tumors, such as lung cancer, human breast carcinoma, pancreatic cancer, non-small cell lung cancer, and colorectal cancer (30; 31; 32; 33; 34). Restored expression of this gene in tumor cells suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis in animal models (11, 27) and its residual expression level in tumor tissues often correlates with better prognosis (28, 29). However, knowledge of underlying molecular mechanisms mediated by RECK in tumor suppression is limited, and little is known about its functions at the single cell level. Therefore, better understanding of RECK gene function would provide valuable insight into why tumors with lower expression tend to be more aggressive (35).

The initial aim of this study was to investigate the effects of RECK overexpression on MMPs during the migration and invasion processes in a glioma model. However, we observed cells with highly compromised migration and invasion ability even though activities of various MMPs were not altered. Migration and invasion assays were performed in the presence of GM6001, an MMP synthetic inhibitor, in order to evaluate the role of MMPs. Invasion of glioma control cells (low RECK expression) was significantly inhibited by the presence of

GM6001, indicating that MMP activity is essential for the invasive process through Matrigel®, as expected. Interestingly, invasion was further unaltered in the GM6001-treated RECK+ cells, suggesting that RECK overexpression has effects on the invasion process independent of MMP activity. Besides that, RECK+ cells, were able to form less colonies than control cells resembling its inability to form metastasis.

Recently Gabriely and co-workers (16) observed RECK expression, as a target of miR-21, was accompanied by a decrease in migratory ability and invasion due to a decrease in MMP-2 activity *in vitro* in glioma model. It has been shown that microRNA-21 is upregulated in gliomas, and that its inhibition leads to elevated levels of RECK, suggesting a possible explanation as to why there is low RECK expression in many gliomas. On the other hand, our results suggest that migratory ability invasion can be compromised by RECK expression through other effect than MMPs regulation, such as cytoskeleton modifications showed here. We however cannot discard the possibility that RECK can regulate extracellular matrix metalloproteinases other than those examined in this study, as described for ADAM10 (12) and CD13 aminopeptidase N (36).

RECK and cytoskeleton rearrangement

Cell migration requires polarization and actin polymerization for the formation of motility-associated processes, such as lamellipodia. While cell polarization involves the centrosome reorientation in the direction of the movement, lamellipodia are actin-based protrusions that establish new contacts with the ECM substrate. These immature contacts are very dynamic and may disappear or mature into focal contacts, which are sites of insertion of stress fibers. Excessive membrane activity at the border of lamellipodia generates membrane ruffles. In tumour cells and transformed cells, metalloproteases associated with the lamellipodium mediate proteolysis of ECM constituents, including fibronectin, laminins and collagens. To further investigate the modifications on motile capacity of RECK overexpressing cells, the actin and tubulin cytoskeleton was

analyzed. Interestingly, we observed that RECK⁺ clones revealed greater amounts of actin stress fibers, which are known to form strong adhesions to substrates, and lesser amounts of lamellipodia and membrane ruffles, when compared to control cells. This phenotype is usually associated with low motility and great stability.

FAK over-expression in gliomas has been reported extensively (37). In different tumors, including glioma, increased FAK expression is observed when compared to non-neoplastic tissues. FAK can promote tumor growth, and a role for FAK in glioma pathogenesis is suggested by its expression and localization (38). FAK has also been associated with adhesion turnover, more than with adhesion formation. In this study phospho-FAK was mostly associated with focal complexes in control cells and focal adhesions in RECK⁺ cells, which show little amount of focal complexes. Compared to its distribution in focal complexes (as small dots), phospho-FAK in focal contacts formed elongated structures clearly associated with the insertion of stress fibers, suggesting an accumulation at these junctions.

Our results illustrate that in a human glioma model, forced RECK expression did not compromise MMP function, but was responsible for cytoskeletal rearrangement and differences in phospho-FAK distribution, which were certainly underlying the defective cell motility. This is an important finding in glioma, since its accelerated invasion is often a main feature contributing to treatment failure.

These findings are in accordance with those published by Morioka (35), regarding RECK-mediated effects on the cytoskeleton of fibroblasts and fibrosarcoma cells. They reported that cells lacking RECK lose their anterior-posterior polarity, decrease spreading with increased speed, and decrease directional persistence in migration. Our data suggests that in a glioma model, forced expression of RECK correlates with a significant decrease in invasion and migration, associated with a highly contractile and stable phenotype.

Morioka and co-workers (35) also showed that focal adhesions and stress fibers were affected in normal cells that lacked RECK expression, since these cells were rimmed by dense accumulation of amorphous focal adhesions and thin, short actin fibers.

T98G glioma cells are able to invade as well as migrate, and introduced RECK expression in these cells compromise this ability. Furthermore, in our glioma model, forced RECK expression had no significant effect on MMPs. Regarding the inversion correlation of glioma grade and RECK expression described by Gabriely and co-workers (16), the present results could contribute to reveal a novel MMP-independent role of RECK in the invasiveness of glioma. Cytoskeleton arrangement in human tissue samples and its correlation with RECK gene should be further explored to elect RECK as a real molecular therapy target.

Conclusion

In contrast to previous data indicating that tumor suppressor functions of RECK can be mediated via inhibition of MMP activity, we have now shown that overexpression of RECK has little to no effect on MMP-2 and MMP-9 activity in a glioma model. Rather, our data has shown that RECK effectively inhibits the invasive process in an MMP-independent fashion, most likely through cytoskeleton rearrangement of actin filaments, preventing migratory ability of these cells. This data supports the concept that low level RECK found in gliomas, provides migration and invasion advantages to these highly motile and aggressive tumor cells, characteristics responsible for the poor efficacy of current available treatments.

Legends of Figure:

Figure 1: RECK overexpression and its effect on MMPs. Evaluation of gene expressions (A, real time qPCR); protein expression (B, immunoblotting) and activity (C, zymography) of RECK, MMP-2, -9 and -14 following RECK overexpression. HT1080 supernatant was used as a control for MMP-2 and -9 activities (C). This data indicates little to no effect of RECK overexpression on MMP levels or activity.

Figure 2: Suppression of human glioma cell line invasion by RECK overexpression. RECK+ and control cells were added to a transwell chamber covered with Matrigel, and the invasion capacity was evaluated in the presence and absence of a synthetic MMP inhibitor (GM6001). Invaded cells were fixed, stained and visualized by microscopy. (A) Microphotographs of representative cell fields for each treatment (20X magnification). Data is represented as mean $\pm$ SD obtained by counting six different fields for each treatment. (B) Quantification of invading cell numbers. Note that GM6001 inhibited invasion of control cells (T98G and mock) only, evidence that invasion inhibition caused by RECK overexpression is independent of MMP activity.

Figure 3: (A) RECK overexpression affects glioma cell motility. (A) Visualization of cell migration following a scratch through confluent monolayer of T98G, Mock, or RECK+ glioma cells. Images were taken at 0 and 24 hours post-scratch. (B) shows a numerical representation of a transwell assay, performed without extracellular matrix coating, to assess the motility of these cells. Data represented as mean $\pm$ SD, obtained by counting six different fields for each treatment. The experiment was performed in duplicate and repeated four times.

Figure 4 : Histochemical and immunohistochemical staining for cytoskeleton proteins of T98G, Mock, and RECK+ glioma cells (A-C; D-F; G-I, respectively): actin (left column) and tubulin (middle column) staining provides evidence that RECK overexpression causes cytoskeletal modifications. Control migrating cells present evident lamellipodia, which are dependent upon actin polymerization; their morphology is polarized and adhesions to the substrate tend to be immature (A and D). Microtubules are present throughout the cells, including in lamellipodia (B and E) RECK+ cells (G) display a greater amount of actin bundles, in contractile structures that include myosin II named stress fibers. Microtubules (H) are less dispersed throughout the cytoplasm and concentrate in a region close to the cell nucleus, probably the centrosome. These cells form strong adhesions to the substrate and are less motile. Inserts represent the negative control. Bar = 30 μ m and 60 μ m for the insert.

Figure 5: Histochemical staining for F-actin (left column) and immunohistochemical staining for phospho-FAK (middle column) of T98G, Mock, or RECK+ glioma cells (A-C; D-F; G-I, respectively). Besides a cytoplasmic pool, phospho-FAK is mostly observed in immature focal complexes in control cells

(arrows) and mature focal adhesions (arrowheads) in RECK+ cells (H). Observe the association of actin bundles with focal adhesions.

Figure 6: Histochemical staining for F-actin (left column) and immunohistochemical staining for RECK (middle column) of T98G, Mock, or RECK+ glioma cells (A-C; D-F; G-I, respectively). Reck was present exclusively at the leading edge, mostly associated with membrane ruffles in lamellipodia. A higher amount of RECK in the overexpressing RECK+ cells was observed, as expected (in order to show this result, atypical RECK+ cells presenting large lamellipodia were picked). RECK distribution was similar between control and RECK+ cells. Inserts represent the negative control. Bar = 30 μ m and 60 μ m for the insert.

Figure 7: Upper panel showing staining for actin 24h after the scratch of T98G, Mock, or RECK+ glioma cells (A, B and C respectively). Note the different disposition of actin fibers with highly dense filaments, supporting the hypothesis that RECK+ cells migrate differently from control cells. Lower panel (D, E and F): Transmission electron microscopy showing the surface of T98G (D), Mock (E) and RECK+ (F) cells when cultured over collagen type I gel for 7 days. RECK+ cells clearly show less membrane activity, with no motility-associated processes. Bar = 50 μ m.

Figura 8: Soft agar assay. Colonies formed in soft agar assay, after 30 days in culture, for the control cell lines (A and B) and RECK+ cells (C). Quantification of colonies, showing a significant decrease both in size and in number of colonies formed in RECK+ cells (D).

References

1. Lassamn & Holland, *Incorporating molecular tools into clinical trials and treatment for gliomas?* **Curr Opin Neurol**. 2007 Dec;20(6):708-11.
2. Iwamaru A, Kondo Y, Iwado E, Aoki H, Fujiwara K, Yokoyama T, Mills GB, Kondo S. *Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells.* **Oncogene**. 2007 Mar 22;26(13):1840-51.
3. Honma K, Miyata T, Ochiya T. *Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells.* **Cancer Cell Int**. 2007 Jun 20;7:12.
4. Lopez-Otin C & Matrisian LM. *Emerging roles of proteases in tumour suppression.* **Nat Rev Cancer**. 2007 Oct;7(10):800-8.
5. Levicar N, Nuttall RK, Lah TT. *Proteases in brain tumour progression.* **Acta Neurochir**. 2003 Sep;145(9):825-38.
6. Welm B, Mott J, Werb Z. *Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK.* **Curr Biol**. 2002 Mar 19;12(6):R209-11.
7. Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM, Noda M, Sogayar MC. *Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene.* **Cancer Detect Prev**. 2002; 26(6):435-43.
8. Takagi S, Hoshino Y, Osaki T, Okumura M, Fuginaga T. *Expression of membrane-anchored matrix metalloproteinase inhibitor reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs in murine cell lines.* **Exp Oncol**. 2007 Mar;29(1):30-4.
9. van Lent PL, Span PN, Sloetjes AW, Radstake TR, van Lieshout AW, Heuvel JJ, Sweep CG, van den Berg WB. *Expression and localisation of the new metalloproteinase inhibitor RECK (reversion inducing cysteine-rich protein with*

- Kazal motifs*) in inflamed synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. 2005 Mar;64(3):368-74.
10. Paulissen G, Rocks N, Quesada-Calvo F, Gosset P, Foidart JM, Noel A, Louis R, Cataldo DD. *Expression of ADAMs and their inhibitors in sputum from patients with asthma*. **Mol Med**. 2006 Jul-Aug;12(7-8):171-9.
 11. 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.
 12. Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EP, Omura A, Miki T, Takahashi R, Matsumoto N, Ludwig A, Noda M, Takahashi C. *RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity*. **Nat Neurosci**. 2007 Jul;10(7):838-45.
 13. Kondo S, Shukunami C, Morioka Y, Matsumoto N, Takahashi R, Oh J, Atsumi T, Umezawa A, Kudo A, Kitayama H, Hiraki Y, Noda M. *Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells*. **J Cell Sci**. 2007 Mar 1;120(Pt 5):849-57.
 14. Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J, Kawashima S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M. *The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors*. **Oncogene**. 2005 Sep 1;24(38):5850-7.
 15. Corrêa TC, Brohem CA, Winnischofer SM, da Silva Cardeal LB, Sasahara RM, Taboga SR, Sogayar MC, Maria-Engler SS. *Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness*. **J Cell Biochem**. 2006 Sep 1;99(1):156-67.
 16. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. *MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators*. **Mol Cell Biol**. 2008 Sep;28(17):5369-80.
 17. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector*. **Gene**. 1991 Dec 15;108(2):193-9.

18. Livak KJ & Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method* **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8.
19. Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. **Nat Protoc**. 2007;2(2):329-33.
20. Lochter A, Srebrow A, Simpson CJ, Terracio N, WerbZ and Bissell MJ. *Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties*. **J. Biol. Chem.** (1997) 272, 5007-5015.
21. Galardy RE, Cassabonne ME, Giese C, Gilbert JH, Lapierre F, Lopez H, Schaefer ME, Stack R, Sullivan M, Summers B. *Low molecular weight inhibitors in corneal ulceration*. **Ann N Y Acad Sci**. 1994 Sep 6;732:315-23.
22. Fiebig HH, Maier A, Burger AM. *Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery*. **Eur J Cancer**. 2004 Apr;40(6):802-20.
23. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. *Clonogenic assay of cells in vitro*. **Nat Protoc**. 2006;1(5):2315-9.
24. Louis DN. *Molecular pathology of malignant gliomas*. **Annu Rev Pathol**. 2006;1:97-117.
25. Aubert M, Badoual M, Christov C, Grammaticos B. *A model for glioma cell migration on collagen and astrocytes*. **J R Soc Interface**. 2008 Jan 6;5(18):75-83.
26. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. *Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment*. **J Clin Oncol**. 2003 Apr 15;21(8):1624-36.
27. 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*, 1998. **95(22)**: 13221-6.
28. Noda M, & Takahashi C. *Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. Cancer Sci*. 2007 Nov; 98(11):1659-65.
 29. Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, Noda M. *Reck forms cowbell-shaped dimers and inhibits MMP-catalyzed cleavage of fibronectin. J Biol Chem*. 2008 Nov 20.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. Takenaka K, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Hasegawa S, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M, Ito H, Wada H, Tanaka F. *Prognostic significance of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs expression in resected pathologic stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer. Ann Surg Oncol*. 2005 Oct;12(10):817-24.
 34. 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.
 35. Morioka Y, Monypenny J, Matsuzaki T, Shi S, Alexander DB, Kitayama H, Noda M. *The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal*

- adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. Oncogene.* 2009 Mar 19;28(11):1454-64.
36. Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M, Takahashi C. *The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. J Biol Chem.* 2007 Apr 20;282(16):12341-52.
37. Golubovskaya VM, Kweh FA, Cance WG. *Focal adhesion kinase and cancer. Histol Histopathol.* 2009 Apr;24(4):503-10.
38. Shi Q, Hjelmeland AB, Keir ST, Song L, Wickman S, Jackson D, Ohmori O, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN. *A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. Mol Carcinog.* 2007 Jun;46(6):488-96.

T98G

Mock

RECK +