

MAÍRA DE ASSIS LIMA

Influência dos hormônios esteroidais na migração, invasão e expressão das proteases ADAMTS1 e 4 em células derivadas de tumores de ovário.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Morais Freitas

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

RESUMO

LIMA, M. A. **Influência dos hormônios esteroidais na migração, invasão e expressão de proteases ADAMTS 1 e 4 em células derivadas de tumores de ovário.** 2015. 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer de ovário é uma neoplasia ginecológica de difícil diagnóstico, pois devido à localização desses órgãos, a maioria das pacientes apresenta estágios avançados da doença quando diagnosticadas. Alternâncias hormonais, que estão associados com a menopausa, tais como uma diminuição nos níveis de estrogênio e de progesterona, e um consequente aumento do nível sistêmico dos hormônios gonadotróficos poderia ter um papel na manifestação da doença. Os hormônios sexuais modulam diversas atividades no câncer, influenciando desde o processo de tumorigênese, crescimento celular e metástase. As ADAMTS's (*adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ou *adamalysin-thrombospondin*) são proteases secretadas que estão envolvidas em funções como o processamento de colágeno em procolágeno N-proteinase, clivagem dos proteoglicanos da matriz e angiogênese. Nosso objetivo nesse trabalho foi avaliar se há influência do estrogênio, progesterona e/ou testosterona nos níveis de expressão de mRNA, proteínas e distribuição das proteases ADAMTS1 e 4 e avaliar a capacidade destes hormônios em induzir a migração e invasão em células tumorais humanas de ovário. As linhagens NIH-OVCAR-3 e ES-2, derivadas de câncer de ovário humano, apresentam diferentes graus de malignidade. As linhagens foram tratadas com os hormônios progesterona, estrogênio ou testosterona e foram comparadas com a amostra controle, que não recebeu tratamento. Os níveis de mRNA foram avaliados por PCR em tempo real e os níveis proteicos foram analisados por *Immunoblot*, além de imunofluorescência para verificar a localização dessas proteases. A análise do mRNA demonstrou que o estrogênio e a testosterona induziram uma menor expressão gênica das proteases ADAMTS1 e 4 em relação ao controle para a linhagem ES-2, houve o aumento do mRNA de ADAMTS 1 e 4 com o tratamento com a progesterona. Já para na linhagem NIH-OVCAR-3 não houve diferenças estatisticamente significantes para a expressão de mRNA. Na análise da proteína, a progesterona foi capaz de induzir aumento nos níveis proteicos de ADAMTS1 e 4 no lisado das linhagem NIH-OVCAR-3 e ES-2. Além disso, a progesterona diminuiu a atividade migratória da linhagem NIH-OVCAR-3 e a capacidade migratória e de invasão da linhagem ES-2. Através de imunofluorescência observamos a presença pontual de ADAMTS1 no núcleo das células, enquanto que a protease ADAMTS4 mostrou-se dispersa por todo o núcleo e citoplasma. Desta maneira, concluímos que a progesterona regula a expressão das ADAMTS 1 e 4, além de reduzir a invasão e migração de células derivadas de câncer de ovário.

Palavras-chave - Câncer de ovário. Matriz extracelular. Metaloproteinases da matriz. ADAMTS1 e 4. Hormônios.

ABSTRACT

LIMA, M. A. **Influence of steroid hormones in the migration, invasion and expression of ADAMTS1 and 4 proteases in ovary cancer cells.** 116 p. Master Thesis (Cellular and Tissular Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Ovarian carcinoma is the leading cause of gynecological neoplastic death, being associated primarily with deregulation of sex hormones. Sex hormones influence tumorigenesis, cell growth and metastasis. ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs or *adamalysin-thrombospondin*) are secreted proteases involved in collagen processing, cleavage of the proteoglycan matrix and angiogenesis. Our aim is to assess whether sex hormones would affect ADAMTS1 and 4 expressions in ovarian cancer cells. We analyzed mRNA and protein levels in human ovarian tumor cells with different degrees of malignancy, NIH-OVCAR-3 and ES-2. The mRNA analysis showed that estrogen and testosterone induced a decrease on gene expression of ADAMTS proteases 1 and 4 compared to the control for the ES-2 cell line, while progesterone led to an increase in the mRNA levels of these same proteases. For the NIH-OVACR-3 cell line there were no statistically significant differences in mRNA expression. Progesterone increases ADAMTS's protein levels in the lysate and in conditioned medium from NIH-OVCAR-3 and in the lysate from ES-2 cells. Immunofluorescence showed ADAMTS 1 located at the cell nucleus, as punctate accumulation in the nucleolus. ADAMTS4 presented a more diffuse staining pattern appearing dispersed in cytoplasm and nucleus in both cell lines. NIH-OVCAR-3 cells treated with progesterone exhibited decrease migratory activity compared to control and ES-2 exhibited decrease invasion activity. We conclude that progesterone modulates ADAMTS1 and 4 levels in ovarian cancer cell lines and decrease migratory and invasion behavior in ovarian cancer cells.

Keywords - Ovarian cancer. Extracellular matrix. Matrix metalloproteinases. ADAMTS1 and 4. Hormones.



1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. A incidência do câncer está aumentando nos países em desenvolvimento econômico, como resultado do envelhecimento da população e a adoção de estilos de vida associados com o desenvolvimento do câncer, incluindo tabagismo, falta de atividade física e dietas não balanceadas (JEMAL et al., 2011). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, também válida para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - (INCA), 2014).

O câncer é uma doença multifacetada caracterizada por alterações genéticas heterogêneas (GERDES et al., 2014). Células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, ao adquirirem uma sucessão de capacidades que lhes permitam evoluir para um fenótipo maligno. Porém, a biologia dos tumores não se define simplesmente pelas diversas características que as células cancerosas adquirem, mas também abrange contribuições do microambiente tumoral para o processo de tumorigênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Até o momento, seis características principais mostraram estar envolvidas com o desenvolvimento do câncer: autossuficiência de sinais de crescimento; insensibilidade a sinais inibidores de crescimento; aumento do potencial de replicação; evasão à apoptose; sustentação da angiogênese; invasão tecidual e metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

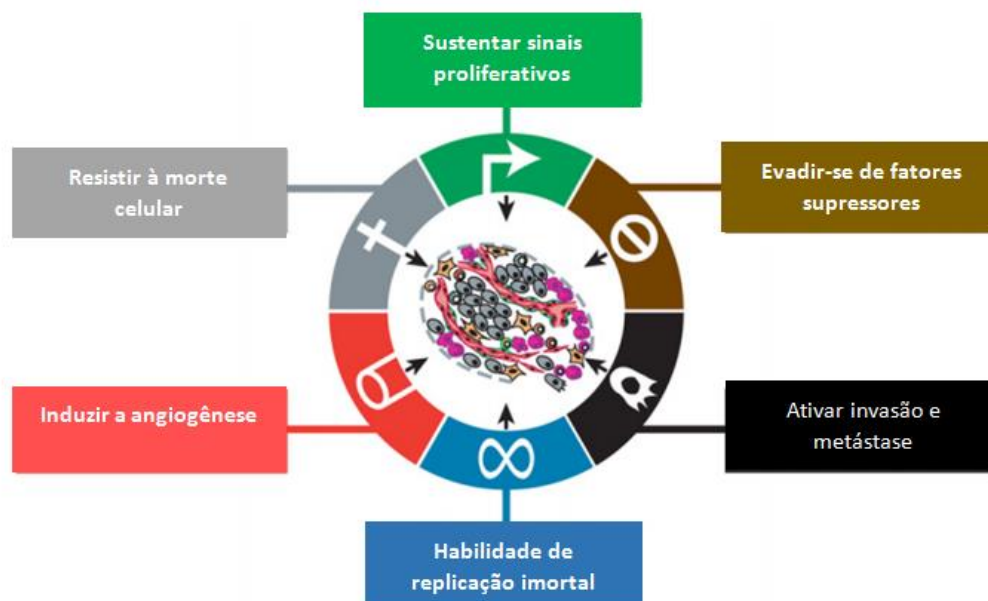


Figura 1 - Capacidades adquiridas pelas células cancerosas. Através de diversos mecanismos, a maioria dos cânceres adquire o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento. Adaptado de (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

Nenhuma célula normal possui a capacidade de proliferar na ausência de sinais estimuladores de crescimento. As células neoplásicas tornam-se independentes desta estimulação de crescimento exógena com a produção de fatores de crescimento os quais irão agir sobre seus receptores, gerando um estímulo proliferativo autócrino (CHENG et al., 2008), hiperexpressão de receptores em sua superfície (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011) ou através do envio de sinais as células normais que respondem às células tumorais fornecendo-as fatores de crescimento (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004). Para a proliferação contínua das células cancerígenas é igualmente necessário que elas evitem a ação dos inibidores de crescimento celular, os quais são essenciais para a homeostasia celular em tecidos normais. Defeitos nestes mecanismos de controle do crescimento celular por feedback negativo permitem aumentar a sinalização da proliferação (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

As células dos mamíferos possuem um programa intrínseco que limita o seu potencial replicativo. O aparato molecular que limita o número de divisões está relacionado com segmentos de DNA nas extremidades dos cromossomos conhecidos como telômeros. Para a progressão tumoral é fundamental que a célula possua potencial replicativo ilimitado. Células malignas mostraram expressão de telomerase, o qual adiciona repetições de hexanucleotídeos aos locais terminais do DNA telomérico, evitando o encurtamento dos telômeros após cada ciclo celular, estabilizando o genoma mutante e conferindo a capacidade ilimitada de replicação (RAYNAUD et al., 2010).

A capacidade de uma população de células neoplásicas expandir em número não depende só da taxa de proliferação celular, mas também da taxa de morte celular (ou apoptose). A apoptose trata-se de uma morte programada e ativa, que requer energia, síntese e degradação proteica (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980). Através dela, os organismos vivos eliminam as células potencialmente prejudiciais, para a manutenção da homeostase (Hengartner, 2000). A resistência a apoptose pelas células neoplásicas pode ser adquirida por vários mecanismos, no entanto, o mais comum consiste em mutações no gene supressor tumoral p53, um gene chave na manutenção da integridade do DNA e na indução da cascata apoptótica (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; HARRIS, 1996).

Para que uma população de células consiga se estabelecer e sobreviva no tecido, elas necessitam fundamentalmente do oxigênio e de nutrientes fornecidos pelos vasos sanguíneos (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011), desta maneira a angiogênese é fundamental para a formação do tumor. Durante a tumorigênese o equilíbrio adequado entre moléculas proangiogênicas e antiangiogênicas e a estimulação por fatores de crescimento parácrinos e autócrinos é perdida (MUELLER; FUSENIG, 2004). O mecanismo principal para a angiogênese, conhecido como a germinação endotelial, depende do aumento na regulação do fator de crescimento endotelial vascular e do desenvolvimento de interações entre as células endoteliais, pericitos,

células estromais, e a associação com a matriz extracelular (MEC) (GORDON; MENDELSON; KATO, 2010).

A capacidade de invadir e gerar metástases permite às células neoplásicas escaparem ao tumor primário e colonizarem novos locais do organismo. Na transição do carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo há o rompimento da membrana basal, pela proliferação de células neoplásicas que possuem elevada capacidade proteolítica. Assim, a travessia das células neoplásicas pelas barreiras da membrana basal é resultado da síntese de proteínas ativas e a aquisição de um fenótipo invasivo (CHRISTOFORI, 2006). Várias classes de proteínas estão alteradas nas células com capacidade de invadir e metastizar, entre as quais as proteínas de adesão célula-célula, como as caderinas, as proteínas que ligam as células a substratos da matriz extracelular, como as integrinas (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004) e proteínas secretadas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (MERDAD et al., 2014).

1.2 Ovários e o câncer de ovário

As glândulas de produção dos hormônios femininos são os ovários. As mulheres têm dois ovários, um de cada lado da pelve em contato com o útero através das trompas. Sua função é produzir o estrogênio e a progesterona que entre outras coisas, regem o ciclo menstrual da mulher, e produzir e armazenar os ovócitos. Os ovócitos são liberados dos ovários a cada ciclo menstrual normal e se encaminham para o útero pelas trompas. O óvulo se fixa na parede interna do útero e se desenvolve num feto depois de fertilizado pelo espermatozóide.

Os ovários na sua camada mais externa são revestidos por epitélio cúbico simples, o qual é sustentado por uma camada de tecido conjuntivo denso denominado de túnica albugínea. Os gametas femininos ou ovócitos localizam-se no interior dos folículos ovarianos que estão presentes na região cortical do ovário. A parte mais interna do ovário é a região medular, formada por tecido conjuntivo frouxo com um rico leito vascular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais). A função do folículo é proporcionar um ambiente ideal para a manutenção da viabilidade, crescimento e maturação do oócito (PICTON et al., 2008).

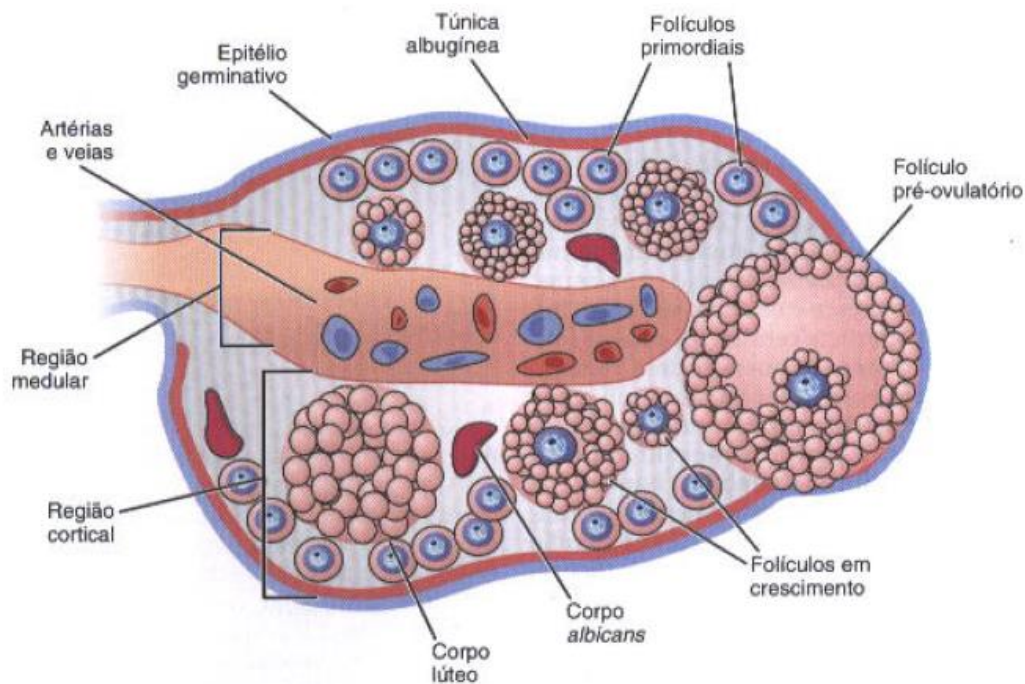


Figura 2 - Desenho esquemático de ovário de uma mulher em idade reprodutiva. No desenho são esquematizados os principais componentes do ovário: epitélio germinativo, túnica albugínea, região cortical e região medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Todos diferentes tipos de células que compõem os ovários podem dar origem a tumores benignos ou malignos. Devido à localização desses órgãos mais de 70% das mulheres apresentam a doença na forma avançada quando diagnosticadas, e mesmo com tratamento, a taxa de sobrevivência em cinco anos das pacientes com carcinoma de ovário é apenas de 30-50%. Este prognóstico pobre é resultado do diagnóstico tardio e da terapia ineficaz para a doença em estágio avançado (WEEN; OEHLER; RICCIARDELLI, 2011), tornando este carcinoma a principal causa de morte neoplásica ginecológica (SAPOZNIK et al., 2009).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer no ano de 2014 houve 5.680 novos casos de câncer de ovário no Brasil (Inca, 2014). A maioria dos tumores de ovário tem origem epitelial (mais de 80%); 10 a 15% são tumores de células germinativas e 5 a 10%, tumores do estroma. Entre os tumores epiteliais, 40% são do tipo seroso, seguidos pelos tumores mucinosos, endometrioides, de células claras e mistos (CHEN et al., 2003).

Os fatores de risco mais comuns associados ao câncer de ovário são: idade, história familiar e a reposição hormonal (GATES et al., 2010; RISTOW; YAMAMOTO; FAVARO, 2006).

O câncer de ovário é raro em mulheres com idade abaixo dos 40 anos, sendo que o risco é aumentado após esta idade, com maiores incidências entre 65 e 79 anos (ADAMI; HUNTER; TRICHOULOPOULOS, 2008).

O câncer de ovário pode estar relacionado ao histórico familiar de carcinoma da mama, ovário ou ambos e nessas pacientes pode incidir em idade mais precoce do que em população geral. Essa síndrome familiar está relacionada à mutação, principalmente, em dois genes, o BRCA-1 e BRCA-2, envolvidos no processo de reparo de DNA (CANNISTRA, 2004).

Estudos mostram que o tratamento de reposição hormonal, tanto o com a utilização somente de estrogênio, como o uso combinado deste com progestina, aumenta o risco em desenvolver câncer de ovário (PEARCE et al., 2009).

Alguns fatores estão relacionados com uma menor incidência do câncer de ovário, como gestação, amamentação, o uso de contraceptivos orais ou ter realizado ligadura tubária ou histerectomia (RICCI et al., 2008).

Concomitante à gestação ocorrem anovulação e supressão pituitária e, logo, há diminuição no risco carcinogênico sobre epitélio ovariano. Assim, teoricamente, cada gestação adicional está associada com diminuição de risco de carcinoma de ovário (JEPPSSON; RANNEVIK; THORELL, 1977; SCHOCKET al., 2014). Torna-se difícil avaliar o fator protetor da amamentação isoladamente, uma vez que está relacionada à gestação. Assim, muitos estudos são favoráveis ao seu papel protetor (CHIAFFARINO et al., 2005; RIMAN et al., 2002; TUNGET al., 2003).

Contraceptivos hormonais são um fator de proteção estabelecido para o câncer de ovário. Uma reanálise de 45 estudos distintos realizados em 21 países mostrou que quanto mais tempo uma mulher usa anticoncepcionais hormonais, menor o risco de se desenvolver esta neoplasia (BERAL et al., 2008).

Ligação tubária e histerectomia, com conservação de ovários, podem comprometer o suplemento sanguíneo ovariano. Com isso, as sequelas cirúrgicas desses procedimentos, inclusive as circulatórias, agem diminuindo a ação hormonal e, assim, reduzem o risco de câncer de ovário em torno de 80% (RIMAN; NILSSON; PERSSON, 2004).

O quadro clínico é inespecífico sendo que o primeiro sintoma pode ser um leve desconforto na região abdominal inferior. Pode ocorrer acúmulo de líquido no interior da cavidade abdominal, causando inchaço em todo abdômen. Raramente existe sangramento uterino e em estágios avançados pode ocorrer distensão abdominal em decorrência do aumento dos ovários e do acúmulo de líquido (LUIZ et al., 2009).

Diversas modalidades terapêuticas podem ser oferecidas (cirurgia, radioterapia e quimioterapia). A escolha vai depender principalmente do tipo histológico do tumor, do estadiamento clínico e/ou cirúrgico do tumor, da idade

e das condições clínicas da paciente e se o tumor é inicial ou recorrente (RISTOW; YAMAMOTO; FAVARO, 2006).


	Localização primária	casos novos	%
Mulheres 	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 para o sexo feminino. O câncer de ovário aparece entre os principais tipos de câncer que atingem as mulheres. Adaptado de (INCA, 2014).

1.3 Matriz extracelular e o microambiente tumoral

A MEC é um componente essencial dos tecidos, que constitui os organismos multicelulares. A MEC é composta por glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas e água, as quais dão origem a porção fibrilar e à substância fundamental da matriz (BERRIER; YAMADA, 2007). Essas macromoléculas interagem entre si formando uma estrutura tri-dimensional e estão ligadas às células por receptores na superfície da membrana, denominados integrinas. Estruturalmente, estes componentes formam tanto a membrana basal, que é produzido conjuntamente pelas células epiteliais e endoteliais e células do estroma, para separar epitélio ou endotélio do estroma, e uma matriz intersticial, que é feito principalmente por células do estroma (LU; WEAVER; WERB, 2012). Esta organização não é estática, a composição da MEC varia em função do estado diferenciado do tecido e em função da idade. Ela muda durante o desenvolvimento, maturidade, patologias e envelhecimento, logo a organização da MEC é um processo dinâmico (LABAT-

ROBERT, 2012). A MEC circunda as células em todos os tecidos, propiciando suporte estrutural e definindo as características de forma e função dos tecidos (COX; ERLER, 2011). As proteínas da MEC estão envolvidas na interação célula-célula, controlando a arquitetura tissular, orquestrando a adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação celular, estando envolvidas também com a resposta inflamatória, cicatrização, homeostase dos tecidos e órgãos e apresenta um papel central no desenvolvimento embrionário (PARAMESWARAN et al., 2006).

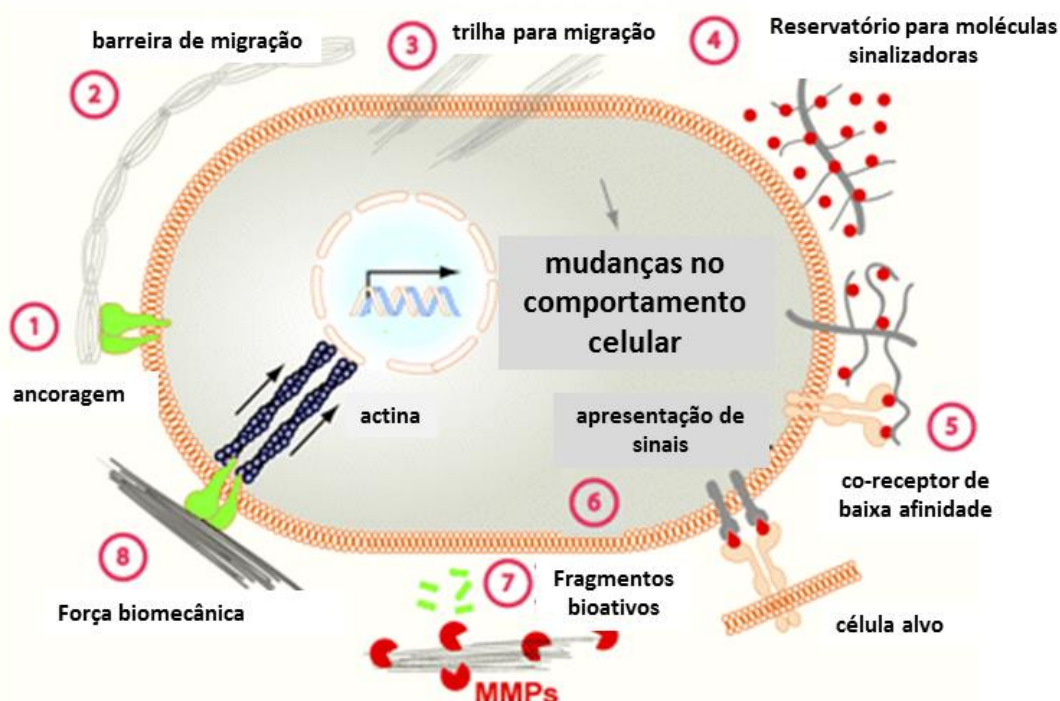


Figura 3 - Mecanismos de função da MEC. Mecanismos de função da MEC. Ancoragem à membrana basal (fase 1). Bloqueia e facilita a migração de células (estágios 2 e 3). Reservatório de moléculas (etapa 4). Co-receptor de sinal (etapa 5) ou um apresentador de sinal (etapa 6). Liberação de fragmentos bioativos (fase 7). Alterações no comportamento celular devido a modificações nos componentes da MEC (fase 8). Adaptado de (LU; WEAVER; WERB, 2012).

As funções versáteis da MEC dependem de suas diversas propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas. A ancoragem à membrana basal é essencial para vários processos biológicos, incluindo a divisão celular

assimétrica, na biologia das células precursoras, e manutenção da polaridade do tecido. Dependendo do contexto a MEC pode servir para bloquear ou facilitar a migração de células. Além disso, a MEC pode se ligar as moléculas de sinalização impedindo a sua difusão livre, atuando como um dissipador para estes sinais e ajudando a formar gradientes de concentração. Alguns componentes da MEC, incluindo proteoglicanos de sulfato de heparan e o receptor para o ácido hialurônico, CD44, podem se ligar seletivamente a diferentes fatores de crescimento funcionando como co-receptores e apresentadores de sinal. A MEC também emite sinais diretos para as células, liberando fragmentos bioativos, os quais foram processados por proteases tais como as MMPs. Finalmente, as células sentem diretamente as propriedades biomecânicas da MEC, incluindo a sua rigidez, o que desencadeia uma grande variedade de comportamentos nas células (LU; WEAVER; WERB, 2012).

As funções desempenhadas pela MEC ovariana estão intimamente relacionadas com a sua diversidade de compartimentos e componentes. Dentre os principais compartimentos, têm a lâmina basal folicular, o fluido folicular, a zona pelúcida e o estroma ovariano. Em cada um deles, existem diferentes componentes encontrados de maneira difusa pelo tecido ovariano, como a fibronectina, colágeno, ácido hialurônico, versican (RODGERS; IRVING-RODGERS; VAN WEZEL, 2000) e proteases como ADAMTS's (*adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ou *adamalysin-thrombospondin*) (SHOZU et al., 2005). A MEC ovariana é importante para a sobrevivência e proliferação das células da granulosa durante a foliculogênese. In vitro, vários estudos têm demonstrado que a presença de componentes da MEC como o colágeno tipo IV, laminina e fibronectina melhoram a proliferação de células da granulosa, aumenta o número de folículos primordiais que entram na fase de crescimento, bem como influenciam a ação dos fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento folicular (WOODRUFF; SHEA, 2007). Proteases que compõem a MEC, como proteases da família ADAMTS já mostraram ser fundamentais para o processo de foliculogênese, além de desempenhar papel na formação de novos vasos linfáticos no estroma ovariano (BROWN et al., 2006; SHOZU et al., 2005).

Já em relação ao seu papel no câncer, estudos genéticos e de biologia celular indicam que o crescimento tumoral de diferentes tipos de carcinoma, dentre eles o câncer de ovário, não é apenas determinado pelo crescimento das células malignas, mas também pelo estroma tumoral (KALLURI, 2003; LILI et al., 2013). O microambiente tumoral é reconhecido por ser produto da interação entre diferentes tipos celulares. Elementos estromais, incluindo fibroblastos associados ao câncer propiciam uma rede de comunicação essencial, via secreção de fatores de crescimento e quimiocinas, induzindo alterações na MEC, proporcionando assim sinais oncogênicos adicionais que aumentam a vascularização, proliferação e invasão tumoral (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Alterações na dinâmica da MEC já foram descritos em diversas doenças e são uma marca registrada no desenvolvimento do câncer. Por exemplo, o excesso ou a diminuição na produção dos componentes da MEC são proeminentes na fibrose do tecido de muitos órgãos (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010) e vários colágenos, incluindo colágeno I, II, III, V e IX, mostraram aumento na deposição durante a formação do tumor (HUIJBERS et al., 2010; KAUPPILA et al., 1998). Além disso, outros componentes da MEC e seus receptores, como proteoglicanos de sulfato de heparan e CD44, que facilitam a sinalização de fatores de crescimento, frequentemente são produzidas em excesso no câncer (NASSER, 2008).

No câncer de ovário alterações nos componentes da MEC mostraram estar relacionados com características mais malignas das células neoplásicas. Níveis elevados de laminina- γ 2, colágenos tipos I e III, fibronectina, sindecam-1, glipicano-1, versicam, e ácido hialurônico e seus receptores CD44 têm sido associados a um mau prognóstico para o câncer de ovário (JANUCHOWSKI et al., 2014; RICCIARDELLI; RODGERS, 2006; SALANI et al., 2007). As metaloproteinases, presentes nesse estroma, que degradam a matriz extracelular, são essenciais para a progressão tumoral e processo metastático (ROCKS et al., 2008). Já foi visto que os passos iniciais para que as células de câncer de ovário sofram metástase ocorre através da clivagem de vitronectina e fibronectina mediada pela metaloproteinase de matriz MMP-2 (KENNY et al., 2008).

1.4 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As MMPs são uma família de mais de 20 subtipos de proteases zinco e cálcio-dependentes, estruturalmente relacionadas. Elas são caracterizadas pela habilidade de degradarem componentes da matriz extracelular, como o colágeno, fibronectina e vários proteoglicanos (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; VISSE; NAGASE, 2003).

Fisiologicamente as MMPs participam das etapas de proliferação celular, diferenciação, remodelamento da matriz extracelular, vascularização, migração celular (CHANG; WERB, 2001), regulação de processos inflamatórios e em doenças como o câncer (GRASSO; BONNET, 2014).

Estas proteínas podem ser classificadas levando em consideração critérios como os mecanismos que desencadeiam uma reação catalítica, substrato de preferência, produtos resultantes e homologia estrutural (PRZEMYSŁAW et al., 2013).

Classificação	Metaloproteinase
Colagenases	MMP 1, MMP 8, MMP 13 e MMP 18
Gelatinases	MMP 2 e MMP 9
Estromelisinases	MMP 3 e MMP 10
Matrilisinases	MMP 7 e MMP 26
MMPs do tipo membrana	MT1-MMP a MT8-MMP
Metaloeleastases	MMP 12

Tabela 2 - Classificação de acordo com os substratos das MMPs.

Independente do substrato que degradam, as MMPs apresentam algumas similaridades estruturais. De um modo geral, elas constituem-se de um peptídeo sinal, um pró-domínio auto inibitório (domínio pró-peptídico), um

domínio catalítico e um domínio hemopexina. Estas são secretadas na forma de precursores inativos (zimogênios) cuja latência é mantida através da interação entre o resíduo de cisteína, que está presente no pró-domínio, e o zinco presente no domínio catalítico, o que impede o acesso ao sítio ativo pelo substrato. Elas podem ser ativadas por outras MMPs, por outras classes de proteases, ou por meio da ação não proteolítica como o estresse oxidativo e detergentes. Estes promovem a clivagem do domínio pró-peptídicos, deixando o sítio catalítico da enzima livre para interação com o respectivo substrato (RA; PARKS, 2007; ROZANOV et al., 2004;). As MMPs regulam uma variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização e também desempenham importante função em processos patológicos, como na comunicação molecular entre o tumor e o estroma (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Portanto, é necessário que haja um controle rígido das atividades das proteases, para evitar danos teciduais indesejáveis. Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são inibidores endógenos das MMPs e promovem o controle da atividade dessas formando um complexo na proporção de 1:1 com o zinco do domínio catalítico, promovendo, assim, um impedimento estérico dessas com os seus substratos (RAFFETTO et al., 2008). O equilíbrio tecidual entre MMPs e TIMPs é primordial para a dinâmica da degradação da matriz extracelular, sendo fundamental para a manutenção da homeostase tecidual, progressão do câncer e metástase (DEVY et al., 2002; HUA et al., 2011).

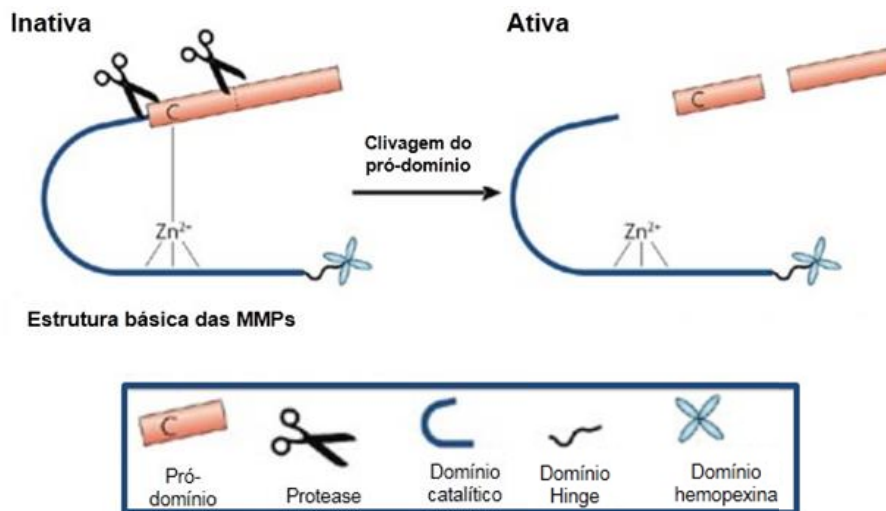


Figura 4 - Estrutura esquemática das MMPs nas formas inativa e ativa. Adaptado de (PAGE-MCCAWE; EWALD; WERB, 2007).

1.5 ADAMs e ADAMTSs

As ADAMs (adisintegrin and metalloproteinase) são glicoproteínas transmembranares caracterizadas pela presença de múltiplos domínios funcionais em sua estrutura. As ADAMs exercem papel fundamental na regulação do fenótipo celular, modulando interação célula-célula, a adesão à matriz extracelular, o processamento proteolítico de diversas moléculas de superfície e a sinalização intra e intercelular (PRIMAKOFF; MYLES, 2000). As ADAMs são caracterizadas por seus domínios estruturais conservados, consistindo de um sinal de sequência N-terminal, seguido por um pró-domínio, um domínio metaloproteinase, um domínio desintegrina com a região rica em cisteína, um domínio EGF (fator de crescimento epidermal), um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática. A modulação da atividade das ADAMs ocorre, assim como nas MMPs, pela remoção do pró-domínio e mudança da sua distribuição intracelular (REISS; SAFTIG, 2009). A natureza fundamental dos processos biológicos controlados pelas ADAMs, indicam que a desregulação dessas enzimas podem contribuir para mecanismos patológicos. Elas têm sido relacionadas com o câncer, doenças neurológicas, cardiovasculares, infecção e inflamação (CHRISTIAN, 2012; EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008). Como metaloproteinases

ativas, as ADAMs podem ter influência na promoção da invasão tumoral e metástase, via clivagem de proteínas presentes na MEC. As ADAMs podem diretamente modular a adesão celular em tumores, por interações com integrinas e proteoglicanos (ARRIBAS; BECH-SERRA; SANTIAGO-JOSEFAT, 2006).

As ADAMTSs (adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs ou adamalysin-thrombospondin) são enzimas semelhantes às MMPs, dependentes de Zn^{2+}/Ca^{2+} (PORTER et al., 2005) secretadas e que estão envolvidas em diversas funções - processamento de colágeno, clivagem dos proteoglicanos da matriz (versican, agrecan e brevican), angiogênese (STANTON et al., 2011; VÁZQUEZ et al., 1999), clivagem da protease do fator de Von Willebrand para a homeostase da coagulação sanguínea, inflamação (Kuno et al., 1997; Apte, 2009), organogênese, fertilidade (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008), estrutura do tecido conjuntivo e câncer (LE GOFF; CORMIER-DAIRE, 2011).

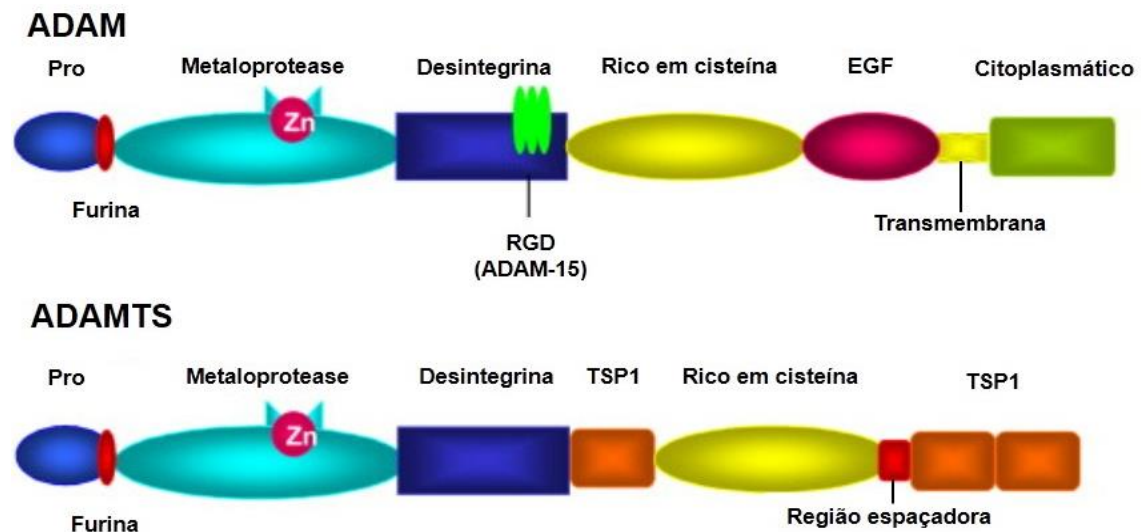


Figura 5 - Estrutura das proteinases ADAM e ADAMTS. Adaptado (ROCKS et al., 2008).

As ADAMTS estão intimamente relacionadas com as proteinases ADAM (Desintegrinas e Metaloproteases) que participam na clivagem do ectodomínio ou na ativação de diversas moléculas da superfície celular, incluindo receptores

de fatores de crescimento e moléculas de adesão. Contudo, ao contrário das ADAM que, com exceções pontuais, são proteínas transmembranares, as ADAMTS são proteínas de secreção, algumas das quais se ligam à matriz extracelular (ECM) (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Após a publicação do primeiro membro da família, ADAMTS 1, em 1997 (KUNO et al., 1997), o sequenciamento completa do genoma humano revelou 19 membros desta família de proteases. Todas as enzimas ADAMTS compartilham de uma estrutura em comum que compreende, a partir do domínio N-terminal, um péptido sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, um domínio semelhante a desintegrina, um domínio trombospondina repetido (TSR) na região central, um domínio rico em cisteína e um domínio espaçador. Com a exceção de ADAMTS 4, todas as outras enzimas ADAMTS tem um domínio TSR na região C-terminal, e alguns membros da família possuem exclusivos módulos adicionais também na porção C-terminal (TORTORELLA et al., 2009).

O pró-domínio é responsável por manter as ADAMTS em latência, ou seja, essas proteínas necessitam de enzimas para torna-lás ativas. Pró-proteínas convertases, como a furina, irão cliva-lás em sítios específicos para que então possam efetuar sua atividade catalítica. Além disso, o pró-domínio mantém a correta conformação das ADAMTS para a sua secreção (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

O domínio catalítico possui a sequência de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH), que é coordenado por três resíduos de histidina (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

O domínio semelhante à desintegrina, corresponde a um domínio pequeno constituído por 60 a 90 aminoácidos com 25 a 45% de similaridade com as desintegrinas do veneno de cobra, no entanto sem o seu arranjo de cisteína canônico (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008). As desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária. Algumas desintegrinas possuem a sequência adesiva RGD através da qual se ligam ao receptor de

fibrinogênio, o que resulta na inibição da agregação plaquetária dependente de fibrinogênio (NIEWIAROWSKI et al., 1994).

O TSR central é muito semelhante em todas as ADAMTS e compreende entre 48 a 54 aminoácidos (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008). Além disso, já foi observado que TSR central possui atividade antiangiogênica e antitumoral (LIU; XU; YU, 2006).

O Domínio rico em cisteína constitui uma sequência bem conservada entre as ADAMTS, contendo 10 resíduos de cisteína. Pode estar associado à adesão e migração das células, uma vez que interage com proteoglicanos de membrana, como o sindecan, envolvido na interação célula-matriz (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

O domínio espaçador apresenta pouca homologia entre as ADAMTS. Pode ser dividido numa metade N-terminal em que vários aminoácidos hidrofóbicos são conservados e em uma metade C-terminal variável (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008). Juntamente com o domínio rico em cisteína, o domínio espaçador, determina o reconhecimento e ligação da protease aos substratos e sua localização na MEC (GENDRON et al., 2007; FUSHIMI et al., 2008).

Os TSRs C-terminal possuem uma sequência muito mais variável que o TSR central. Alguns TSR em determinadas ADAMTS podem ainda conter um motivo BBXB que liga a heparina ou um motivo CVSTCG que liga o receptor de superfície celular CD36 (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

Quatro tipos de módulos C-terminal foram encontrados. As ADAMTS 9 e 20 possuem um módulo encontrado somente no seu ortólogo GON-1 que contém 10 cisteínas conservadas e vários outros aminoácidos conservados. ADAMTS 2, 3, 10, 14 17 e 19 contêm um domínio PLAC, que é encontrado em algumas convertases pró-proteína. Finalmente ADAMTS 13 é o único membro desta família que contém domínios CUB, existindo dois localizados na sua região C-terminal (PORTER et al., 2005; ROCKS et al., 2008).

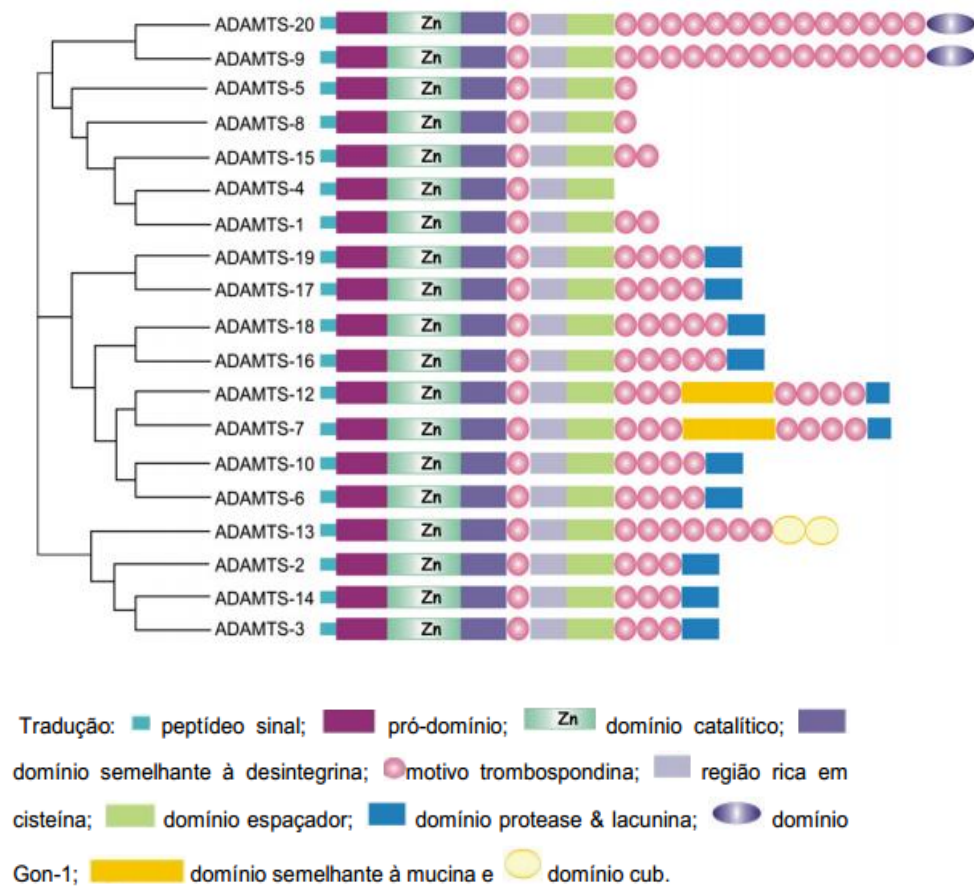


Figura 6 - Domínios estruturais e análise filogenética dos membros da família ADAMTS.

As ADAMTS agrupam-se em pequenas classes e estão organizadas de acordo com sua estrutura molecular, sequência proteica, estrutura do gene e preferência por determinados substratos (ROCKS et al., 2008). A família ADAMTS é geralmente subdividida em 4 classes, baseada nas similaridades estruturais e/ou funcionais: proteoglicanases (ADAMTS 1, 4, 5, 8, 15 e 20), pró-colagenases-n-peptidases (ADAMTS 2, 3 e 14), clivagem do fator de Von Willebrand (ADAMTS 13), degradação da proteína oligomérica da matriz da cartilagem (ADAMTS 7 e 12) e aquelas proteases que as funções permanecem indefinidas (ADAMTS 6, 16, 17, 18 e 19) (APTE, 2009; PORTER et al., 2005).

Substratos	Proteases
Agregam	ADAMTS 1, 4, 5, 9 e 15
Versicam	ADAMTS 1, 4 e 9
Brevicam	ADAMTS 4
Pró- colágeno	ADAMTS 2, 3 e 14
Fator de Von Willebrand	ADAMTS 13
Proteína oligomérica da matriz da cartilagem	ADAMTS 7 e 20
Desconhecido	ADAMTS 6, 16, 17, 18 e 19

Tabela 3 - Classificação de acordo com os substratos das ADAMTSs.

Em relação à regulação, existem evidências que várias ADAMTS são reguladas por fatores de crescimento, hormônios e citocinas inflamatórias. Entre estas moléculas reguladoras encontram-se o TGF- α (WANG et al., 2003), hormônios tireoidianos, nomeadamente a tri-iodotironina (T3) (MAKIHIRA et al., 2003), paratormônio (MILES et al., 2000), hormônio luteinizante, hormônio gonadotrófico coriônico humano e progesterona (ROBKER et al., 2000). Regulando negativamente, as TIMP, inibidores efetivos das metaloproteinases, inibem também as ADAMTS, no entanto, de uma forma mais seletiva (HASHIMOTO et al., 2003).

1.6 ADAMTS 1 e 4

Fisiologicamente ADAMTS 1 foi inicialmente descrita como um mediador da inflamação (KUNO et al., 1997), entretanto já foi demonstrado que esta protease é necessária para o crescimento normal, além de auxiliar na estrutura e no funcionamento dos rins, da glândula adrenal e do aparelho reprodutor feminino (SHINDO et al., 2000), participando da foliculogênese ovariana, na formação de vasos sanguíneos e linfáticos (BROWN et al., 2006) e do processo de ovulação (BROWN et al., 2010).

No ovário, durante o processo de ovulação induzido pelo hormônio luteinizante (LH), a libertação de um ovócito maduro com células do cumulus circundante através do epitélio superficial exige a remodelação da matriz extracelular ovariana (BROWN et al., 2010; NAGASE; WOESSNER, 1999), Estudos mostram que ADAMTS 1 é fundamental para a morfogênese estrutural dos folículos e do estroma ovariano, além de estar relacionado com o desenvolvimento da rede de drenagem linfática do ovário (Brown et al., 2006). Já foi demonstrado que o gene da ADAMTS 1 é exclusivamente expresso em células foliculares da granulosa no momento da ovulação, na matriz que circunda os folículos ovarianos (ESPEY et al., 2000; RICHARDS et al., 2005) e que a indução de ADAMTS 1 é drasticamente reduzida, em ratos, quando a síntese de progesterona é inibida com epostano (agente antiprogesterona), bem como em ratos que não possuem receptor para progesterona (PR) (ROBKER et al., 2000). O padrão temporal da expressão deste gene, em conjunto com sua regulação pela progesterona, sugere que a metaloproteinase deste gene pode ter um papel importante no mecanismo de ovulação.

ADAMTS 1 é sintetizada como um pró-zimogênio e sofre glicosilação logo após a tradução da proteína. A secreção de ADAMTS 1 para a MEC requer a excisão desse pró-domínio da proteína madura de 87 kDa, por endopeptidases furina relacionadas. ADAMTS 1 pode ser processada e ser detectada como uma proteína de 65 kDa. A região C-terminal da protease madura liga-se diretamente na MEC e se associa com outras proteínas tais como fibulina-1, TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) latente e com proteoglicanos sulfatados. A protease catalisa a degradação do colágeno tipo I (REHN et al., 2007), proteoglicanos do estroma de tecidos específicos, como o versicam (RICCIARDELLI et al., 2011; RUSSELL et al., 2003), agregam (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE et al., 2002), sindecam-4 (RODRÍGUEZ-MANZANEQUE et al., 2009) e proteínas da membrana basal (nidogênio 1 e 2) (CANALS et al., 2006; TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013). Assim, a estrutura complexa de ADAMTS 1 pode, portanto, influenciar o ambiente tumoral por uma série de vias (TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013).

Em relação a sua função nos tumores, ADAMTS 1 possui efeito anti-angiogênico (Vázquez et al., 1999; Iruela-Arispe, Carpizo e Luque, 2003; Lee et al., 2006), no entanto, alguns trabalhos mostram que ADAMTS 1 tem sua expressão aumentada em tumores de alto grau de malignidade (Masui et al., 2001), podendo promover a proliferação (LIU; XU; YU, 2006), sobrevivência (RICCIARDELLI et al., 2011), migração e invasão celular (TYAN et al., 2012), talvez devido a sua capacidade de degradar o agrecan e o versican, os quais são componentes da matriz extracelular que funcionam como barreira a passagem da células. Dados do nosso laboratório mostram que em tumores mais agressivos de mama, existe uma diminuição nos níveis de ADAMTS 1 quando comparados ao tecido normal (FREITAS et al., 2013). Uma revisão da literatura mostra que o valor de expressão da proteína de ADAMTS1 está reduzida em diferentes tipos de câncer, inclusive no câncer de ovário (TAN; RICCIARDELLI; RUSSELL, 2013).

Liu et al., 2006 (LIU; XU; YU, 2006) demonstraram que a ADAMTS 1 sofre auto-clivagem proteolítica, e que a proteína de ADAMTS 1 sem clivagem e os seus fragmentos exibem atividade pro- e anti-tumoral, respectivamente. Observou-se também que a atividade de metaloproteinase de ADAMTS 1 é necessária para o seu potencial pro-tumoral, favorecendo a metástase. Além disso, foi demonstrado que a atividade anti-tumoral dos fragmentos de ADAMTS 1 dependem do motivo TSP-1, que é mascarado na molécula de comprimento total, indicando que o efeito de ADAMTS 1 sobre a metástase do tumor depende se a molécula está clivada ou intacta.

A ADAMTS 4 foi inicialmente designada como "agrecanase 1" com base na sua capacidade para clivar a ligação Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ da proteína agrecan (TORTORELLA et al., 1999). Atualmente sabe-se que esta protease também é responsável pela clivagem de outros componentes da MEC, como o versican (SANDY et al., 2001) e o brevicam (MATTHEWS et al., 2000). Ela está envolvida com a remodelação da cartilagem e inflamação (KUNO et al., 2000), no processo de ovulação (RICHARDS et al., 2005), a modulação da plasticidade neural (TAUCHI et al., 2012) e esta presente nas fases precoces da destruição da cartilagem na artrite reumatoide e na osteoartrite (NAGASE;

KASHIWAGI, 2003; NAITO et al., 2007). ADAMTS 4 está presente em diversos tecidos como a medula espinal, útero, cérebro, coração e o ovário (WESTLING et al., 2002).

No ovário, ADAMTS 4 é expressa em células da granulosa de pequenos folículos em crescimento e tem sua expressão aumentada em resposta ao tratamento com gonadotrofina coriônica humana (hCG) (RICHARDS et al., 2005). Antes do processo de ovulação, ADAMTS4 é induzida seletivamente nas células da teca dentro de 2 a 4 horas após a administração de hCG. A indução específica de ADAMTS4 nestas células e nesta fase do desenvolvimento folicular sugere que esta protease participa na cascata proteolítica, através da qual componentes da lâmina basal são degradados antes da ovulação e luteinização (RICHARDS et al., 2005).

ADAMTS 4 está estruturalmente e funcionalmente relacionada com ADAMTS 1. Possuem um peptídeo sinal, um pró-domínio que é clivado pela furina no momento da secreção, um domínio metaloproteinase que realiza a proteólise seletiva dos proteoglicanos da família hyalectan (formada pelos proteoglicanos agrecan, versican, brevican e neurocan), um domínio desintegrina com o potencial de se ligar as integrinas presentes na membrana celular e responsáveis pela adesão das células com a MEC, e uma região carboxi-terminal com motivos TSRs. O domínio TSR da ADAMTS 4 mostra fortes semelhanças com a sequência TRS da ADAMTS 1 (KARAGIANNIS; POPEL, 2007) e esta mostrou conter propriedades antiangiogênicas (LIU; XU; YU, 2006). Desta maneira ADAMTS 4 pode estar envolvida em processos antitumorígenicos.

Entretanto muitos dos substratos de ADAMTS 4 são proteoglicanos presentes em abundância na MEC. Por isso, é possível que esta metaloproteinase de vários domínios possa desempenhar um papel na angiogênese e progressão do tumor (KUMAR; RAO; GE, 2012). O aumento da expressão de ADAMTS4 foi observada em vários tipos de câncer humanos, como o de mama (PORTER et al., 2004), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (DEMIRCAN et al., 2009) e glioblastoma (HELD-FEINDT et al., 2006)

Usando um modelo de implante de tumor de melanoma de rato singênico, foi demonstrado que ADAMTS 4 sem clivagem, o qual possui seu domínio metaloproteinase ativo, foi capaz de promover o crescimento do câncer. Em contraste, as regiões C-terminais auxiliares e a proteína sem clivagem com ausência do domínio metaloproteinase inibiram o crescimento do tumor (RAO et al., 2013). Assim, ADAMTS 4 possui propriedades semelhantes a ADAMTS 1, uma vez que age de forma pro e antitumorigênica.

1.7 Hormônios sexuais

Hormônios esteroidais são moléculas regulatórias de natureza lipídica que atuam através de receptores localizados no núcleo das células alvo. Quando ocorre a ligação do hormônio ao seu receptor, este passa por uma mudança conformacional que o ativa, formando complexos e tornando-o capaz de promover ou inibir a transcrição de um grupo específico de genes (ALBERTS et al., 2002; COUSE; HEWITT; KORACH, 2006).

Os receptores de estrógeno (Er α e Er β) apresentam localização nuclear, assim como os receptores para andrógenos (AR), já os receptores de progesterona (PR) podem ter localização nuclear ou na membrana plasmática, e todos estes apresentam a estrutura clássica dos receptores de esteróides, composta por 4 domínios distintos: um domínio N-terminal regulador da transcrição, um domínio de ligação ao DNA com os clássicos dedos de zinco proximal e distal, uma região “dobradiça” e um domínio de ligação ao seu respectivo hormônio (COUSE; HEWITT; KORACH, 2006; MOSSELMAN; POLMAN; DIJKEMA, 1996;).

Estes hormônios estão integrados em cada aspecto da fisiologia reprodutiva dos mamíferos, em ambos sexos, incluindo o desenvolvimento, gametogênese, função das gônadas, do controle hipotálamo – pituitária, comportamento sexual e maternal, gestação e lactação.

Os hormônios esteroidais são produzidos em tecidos específicos do corpo e são divididos em duas classes, os hormônios sexuais e progesteracionais e os hormônios adrenais. O colesterol é o esteroide de maior prevalência no organismo e precursor, entre outros, de hormônios sexuais como os estrógenos e as progestinas (LITWACK; TJ, 1998).

Diferentes tipos de células do ovário sintetizam preferencialmente determinados hormônios sexuais, as células da teca, por exemplo, produzem principalmente a androstenediona, hormônio esteroide precursor do andrógeno testosterona e dos estrógenos estrona e estradiol. A progesterona é produzida principalmente pelas células que formam o corpo lúteo, glândula endócrina temporária formada após o processo de ovulação. O tipo de hormônio esteroide produzido pelas células também muda com sua progressiva maturação, as células da granulosa de folículos em crescimento secretam principalmente estradiol e pouca ou nenhuma progesterona, enquanto após a ovulação, as células da granulosa luteinizadas secretam principalmente progesterona (PETERS; MCNATTY, 1980).

A mulher adulta é exposta continuamente a flutuações hormonais ao longo da vida, até a menopausa, como um resultado de ciclos reprodutivos, conhecidos como ciclos hormonais. Os ciclos são controlados pelo eixo hipotálamo-pituitária-ovário (HAWKINS; MATZUK, 2008).

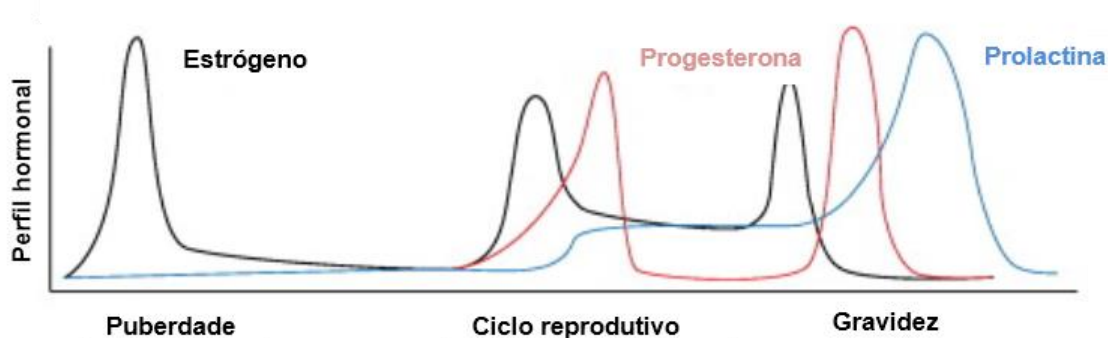


Figura 7 - Flutuação dos níveis hormonais durante os ciclos fisiológicos femininos. Na puberdade, os altos níveis de estrógeno atuam nas células hormônio-responsivas, estimulando a proliferação. Na fase lútea do ciclo reprodutivo, ocorre um

aumento de progesterona estimulando as células hormônio-responsivas à proliferação. No início da gravidez, a progesterona juntamente com a prolactina, atuam estimulando a mama para a secreção láctea. Adaptado de (JOSHI; DI GRAPPA; KHOKHA, 2012).

A progesterona e o estradiol são importantes reguladores dos processos de proliferação e diferenciação celular no trato genital feminino. Alterações da resposta destes hormônios podem estar relacionadas ao aparecimento de doenças estrogênio-dependentes como a endometriose, câncer de endométrio, infertilidade, câncer de mama e ovário (ROMANO et al., 2006).

No câncer os hormônios sexuais modulam a proliferação, apoptose, migração, metástase e angiogênese, influenciando desde o processo de tumorigênese, o crescimento celular e a metástase (RAMACHANDRAN, 2011). O papel dos hormônios no câncer de ovário incluem fatores de proteção e de risco para a doença. Contraceptivos hormonais são um fator de proteção estabelecido para o câncer de ovário. Uma reanálise de 45 estudos distintos realizados em 21 países mostrou que quanto mais tempo uma mulher usa anticoncepcionais hormonais, menor o risco de se desenvolver esta neoplasia (BERAL et al., 2008). Estudos mostram que o tratamento de reposição hormonal, tanto o com a utilização somente de estrogênio, como o uso combinado deste com progestina, aumenta o risco em desenvolver câncer de ovário (PEARCE et al., 2009).

1.8 Progesterona

A progesterona é produzida pelo corpo lúteo, uma estrutura glandular transitória, que inicia seu desenvolvimento no ovário imediatamente após a ovulação, e esta relacionada com a preparação do útero para a aceitação do embrião, à preparação das mamas para a secreção láctea, o crescimento folicular, a ovulação e a luteinização (SCHAMS; BERISHA, 2002).

A progesterona (P4) ou respostas celulares a P4 parecem oferecer proteção contra o desenvolvimento do câncer de ovário (HO, 2003). A progesterona protege as células da hiperestimulação estrogênica, pois diminui o número de receptores para o estrógeno, aumenta seu metabolismo intracelular e inibe a conversão da androstenediona em estrona, reduzindo a atividade mitótica das células (VOIGT et al., 1991). Deficiências de progesterona, devido à menopausa, a infertilidade ou alterações no gene de PR estão associados com um risco aumentado de câncer de ovário (EDMONDSON; MONAGHAN, 2001; SYED et al., 2001). Estudos clínicos têm demonstrado que a multiparidade, a gravidez de gêmeos, e a gravidez que ocorre na vida adulta aumentam drasticamente os níveis de progesterona em circulação e reduzem o risco de desenvolver câncer de ovário (ADAMI et al., 1994; BANKS; BERAL; REEVES, 1997). Além disso, já foi observado que a expressão de receptores para progesterona estão relacionados com um melhor prognóstico em mulheres com câncer de ovário (LEE et al., 2005; LENHARD et al., 2012). O uso de contraceptivo oral hormonal tem sido consistentemente associado a uma redução no risco de desenvolvimento do câncer de ovário (BERAL et al., 2008; DIEP et al., 2015). Já foi observado que formulações de contraceptivos orais com altos níveis de progesterona estão associadas a um menor risco de câncer de ovário do que as formulações com baixos níveis de progestina (SCHILDKRAUT et al., 2002). No entanto, acredita-se que a maior parte dos efeitos protetores da progesterona são mediados pelo receptor da progesterona nuclear (n-Pr), os quais se perdem progressivamente com o aumento do grau de malignidade do câncer de ovário (AKAHIRA et al., 2002).

1.9 Estrógeno

O estradiol, hormônio esteróide produzido pelas células da granulosa de folículos em desenvolvimento (GINTHER et al., 2003) é responsável pelo aparecimento das características sexuais secundárias, inibição do eixo hipotálamo-hipofisário por feedback, estimulação da oogênese, regulação do

endométrio e da homeostase cardiovascular (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSNINA, 2004).

Evidências associam o estrogênio com o aumento da incidência do câncer de ovário (GAMBACCIANI et al., 2003; GREISER; GREISER; DÖREN, 2007). Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que o uso a longo prazo de terapia de reposição hormonal com estrógeno aumenta o risco de câncer de ovário (LACEY et al., 2002; MØRCH et al., 2009), pois diminui a secreção de gonadotrofinas, e já foi observado que níveis decrescentes de gonadotrofinas estão associados a um maior risco no desenvolvimento deste tipo de câncer (HELZLSOUER et al., 1995). Estudos experimentais tanto in vivo como in vitro também implicam um papel do estrógeno na carcinogênese do ovário, pois a sobrevivência e proliferação das células poderiam ser reforçadas por este hormônio (BAI et al., 2000; CHOI et al., 2001; SONG et al., 2005). Os estrogênios estimulam a proliferação de linhagens de células de câncer de ovário e células epiteliais da superfície dos ovários normais em cultura. Em contraste, o crescimento é inibido por antagônistas de ER (SYED et al., 2001). O estrógeno pode melhorar a motilidade das células de tumor do ovário, desencadeando a transformação epitélio mesenquimal através do receptor ER α , além disso é capaz de reforçar a capacidade migratória das células através da maior regulação transcricional dos repressores de E-caderina, Snail e Slug (PARK et al., 2008).

1.10 Testosterona

Em mulheres, a síntese dos andrógenos ocorre principalmente na zona fasciculada da adrenal (25%) e no estroma ovariano (25%). Os 50% restantes são produzidos no fígado, pele e tecido adiposo (EL-ALFY et al., 1999).

Após a testosterona ser sintetizada ocorre a formação do complexo hormônio-transportador (testosterona-proteína transportadora de hormônios sexuais) o qual é liberado na circulação para atingir tecidos-alvos onde o complexo é dissociado para que a testosterona exerça seus efeitos celulares.

O andrógino, então na forma livre, liga-se ao receptor para andrógenos, desencadeando os efeitos celulares deste esteroide (JONES; HUGH JONES; CHANNER, 2004). Dentre os principais efeitos da testosterona estão: a indução das características sexuais secundárias relacionadas com a puberdade (BAIN, 2007), inibição da atividade dos osteoclastos e estimulação da atividade dos osteoblastos levando, portanto, a uma menor reabsorção óssea e maior fixação do osso (Tivesten et al., 2004; Davey e Morris, 2005), desenvolvimento e manutenção da massa muscular (SINHA-HIKIM et al., 2006), efeito sobre a libido, excitação e ereção (MORLEY; PERRY, 2003).

Evidências indiretas sugerem um possível papel etiológico para andrógenos no início e / ou progressão do câncer de ovário. Contraceptivos orais, que suprimem andrógenos, são inversamente associado com o risco de câncer de ovário (GREER et al., 2005) enquanto síndrome dos ovários policísticos e obesidade central, que são caracterizadas por níveis elevados de andrógenos, estão associados com risco aumentado de câncer de ovário (MINK et al., 1996). Além disso, foi relatada em mulheres transexuais submetidas à suplementação de testosterona uma maior incidência de câncer de ovário (DIZON et al., 2006). Vários estudos in vitro demonstraram aumento da proliferação de células epiteliais da superfície de ovários normais após administração de andrógenos (EDMONDSON, MONAGHAN E DAVIES, 2002; SYED et al., 2001). Por fim, os pacientes com endometriose que tinham sido tratados com Danazol (que suprime a secreção hipofisária de gonadotrofinas, mas tem propriedades androgênicas) tiveram um risco 3 vezes maior de desenvolver câncer de ovário, em comparação com os pacientes que tomaram Leuprolide (um hormônio antagonista liberador de gonadotropina) ou nenhuma medicação (NESS, 2003).

1.11 Modelo utilizado

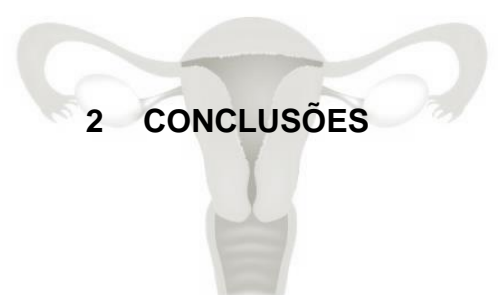
Linhagens celulares derivadas de tumores são os modelos mais utilizados em pesquisa sobre o câncer (DOMCKE et al., 2013), pois essas

amostras patológicas mimetizam o estado real do tumor in vivo e muitas vezes proporcionam resultados reprodutíveis, que fornecem informações para a compreensão da biologia dos tumores e aplicação na clínica médica (VAN STAVEREN et al., 2009).

No presente estudo, utilizamos linhagens de ovário comerciais, com diferentes graus de malignidade. A linhagem ES-2 com fenótipo agressivo, e a linhagem NIH-OVCAR-3 com fenótipo menos agressivo e mais diferenciado.

Carcinoma de células claras (CCC) do ovário é um subtipo de câncer epitelial de ovário conhecido por sua relativa resistência à quimioterapia baseada em platina e de prognóstico ruim (KWOK et al., 2014). ES-2 é uma linhagem de CCC humana estabelecida em 1980 a partir de uma amostra de tumor cirúrgico retirado de uma mulher negra de 47 anos. O tumor foi descrito como um carcinoma de células de ovário pouco diferenciado. Inicialmente, as células foram cultivadas em ágar macio, um indicador de transformação e tumorigenicidade. As células exibem uma baixa a moderada resistência para um número de agentes quimioterapêuticos, incluindo doxorubicina, cisplatina, carmustina, etoposido e ciano morfolino doxorubicina (COLLECTION, 2014a). Esta linhagem celular não possui receptores para estrogênio (ER -) (HALON et al., 2011) e receptores nucleares de progesterona (n-PR -); e possui receptores de membrana para a progesterona (m-PR +) (CHARLES; THOMAS; LANGE, 2010).

Adenocarcinoma é um tipo de câncer que se forma nas glândulas secretoras de muco ao longo do corpo. A linhagem NIH-OVCAR-3 foi estabelecida a partir de ascites malignas, de uma mulher caucasiana de 60 anos de idade com adenocarcinoma de ovário progressivo, após a quimioterapia de combinação com ciclofosfamida, adriamicina e cisplatina. A linhagem cresce em monocamada e é tumorigênica em ratos atímicos (HAMILTON et al., 1983). Esta linhagem possui receptores para estrógeno, progesterona e andrógenos (COLLECTION, 2014b).



Baseados nos resultados dos experimentos realizados concluímos que:

1. Os hormônios sexuais alteram os níveis de expressão de mRNA de ADAMTS 1 e 4 na linhagem câncer de ovário mais agressiva, ES-2, após 24 horas de tratamento. Em relação aos níveis proteicos, somente a progesterona foi capaz de aumentar os níveis das proteases ADAMTS 1 e 4 no lisado das linhagens, NIH-OVCAR-3 e ES-2, sendo que esta ação é inibida quando as células são tratadas com progesterona em conjunto com o antagonista do receptor de PR, RU486.
2. A localização da ADAMTS 1 é nuclear, enquanto que ADAMTS 4 está dispersa em todo núcleo e citoplasma celular de ambas as linhagens analisadas.
3. A progesterona foi capaz de diminuir a capacidade migratória e invasiva das células de câncer de ovário analisadas



REFERÊNCIAS¹

ADAMI, H. O. et al. Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. **Lancet**, v. 344, n. 8932, p. 1250-1254, Nov 1994.

ADAMI, H. O.; HUNTER, D.; TRICHOULOPOULOS, D. **Textbook of cancer epidemiology**. Oxford:Oxford University Press, 2008.784 p.

AKAHIRA, J. et al. Differential expression of progesterone receptor isoforms A and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 93, n. 7, p. 807-815, Jul 2002.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. New York:Garland Science,2002.1392 p.

APTE, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily - functions and mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 46, p. 31493-31497, Nov 2009.

ARRIBAS, J.; BECH-SERRA, J. J.; SANTIAGO-JOSEFAT, B. ADAMs, cell migration and cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, n. 1, p. 57-68, Mar 2006.

BAI, W. et al. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 36, n. 10, p. 657-666, 2000 Nov-Dec 2000.

BAIN, J. The many faces of testosterone. **Clin. Interv. Aging.**, v. 2, n. 4, p. 567-576, 2007.

BANKS, E.; BERAL, V.; REEVES, G. The epidemiology of epithelial ovarian cancer - a review. **Int. J. of Gynecol. Cancer**, v. 7, n. 6, p. 425-438, 1997.

BELOT, M. P. et al. Progesterone reduces the migration of mast cells toward the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 with an accompanying decrease in CXCR4 receptors. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 292, n. 5, p. 1410-1417, May 2007.

BERAL, V. et al. Ovarian cancer and oral contraceptives - collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. **Lancet**, v. 371, n. 9609, p. 303-314, Jan 2008.

¹De acordo com - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023** - informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERRIER, A. L.; YAMADA, K. M. Cell-matrix adhesion. **J. Cell. Physiol.**, v. 213, n. 3, p. 565-573, Dec 2007.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-337, Nov 2004.

BROWN, H. M. et al. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice. **Biol. Reprod.**, v. 83, n. 4, p. 549-557, Oct 2010. I

_____. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. **Dev. Biol.**, v. 300, n. 2, p. 699-709, Dec 2006.

CAL, S.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAMTS proteases and cancer. **Matrix Biol.**, p. 350-357, Jan 2015.

CANALS, F. et al. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. **Proteomics**, v. 6 Suppl 1, p. 28-35, Apr 2006.

CANNISTRA, S. A. Cancer of the ovary. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 24, p. 2519-2529, Dec 2004.

CASAL, C. et al. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 11, p. 4676-4686, Jun 2010.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-312, Feb 2004.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases - cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 11, p. 37-43, Nov 2001.

CHARLES, N. J.; THOMAS, P.; LANGE, C. A. Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells - implications for progesterone-induced signaling events. **Horm. Cancer**, v. 1, n. 4, p. 167-176, Aug 2010.

CHEN, V. W. et al. Pathology and classification of ovarian tumors. **Cancer**, v. 97, n. 10 Suppl, p. 2631-2642, May 2003.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, n. 10, p. 1521-1533, Oct 2008.

CHIAFFARINO, F. et al. Breastfeeding and the risk of epithelial ovarian cancer in an Italian population. **Gynecol. Oncol.**, v. 98, n. 2, p. 304-308, Aug 2005.

CHOI, K. C. et al. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2351-2360, Jun 2001.

CHRISTIAN, L. M. The ADAM family - Insights into Notch proteolysis. **Fly (Austin)**, v. 6, n. 1, p. 30-34, 2012 Jan-Mar 2012.

CHRISTOFORI, G. New signals from the invasive front. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 444-50, May 2006.

COLLECTION, A. T. C. **ES-2 (ATCC® CRL-1978™)**. 2014a. **NIH - OVCAR-3 [OVCAR3] (ATCC® HTB-161™)**. 2014b. Disponível em: <<http://www.atcc.org/>>. Acesso em: 02 abril 2015.

COUSE, J. F.; HEWITT, S. C.; KORACH, K. S. **Steroid receptor in the ovary and uterus**. In: Knobil, E.; Neill, J.. *Physiology of Reproduction*. 3. ed. New York: Academic Press, 2006. 593-658 p.

COX, T. R.; ERLER, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix - implications for fibrotic diseases and cancer. **Dis. Model. Mech.**, v. 4, n. 2, p. 165-178, Mar 2011.

DAVEY, R. A.; MORRIS, H. A. Effects of estradiol and dihydrotestosterone on osteoblast gene expression in osteopenic ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 23, n. 3, p. 212-218, 2005.

DEMIRCAN, K. et al. Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer. **Head Neck**, v. 31, n. 6, p. 793-801, Jun 2009.

DEVY, L. et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. **FASEB J.**, v. 16, n. 2, p. 147-154, Feb 2002.

DIEP, C. H. et al. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 54, n. 2, p. R31-R53, Apr 2015. ISSN 1479-6813.

DIZON, D. S. et al. Ovarian cancer associated with testosterone supplementation in a female-to-male transsexual patient. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 62, n. 4, p. 226-228, 2006. I

DOMCKE, S. et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 2126, 2013.

DOYLE, K. M. et al. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. **Mol. Endocrinol.**, v. 18, n. 10, p. 2463-2478, Oct 2004.

EDMONDSON, R. J.; MONAGHAN, J. M. The epidemiology of ovarian cancer. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 11, n. 6, p. 423-439, 2001 Nov-Dec 2001.

EDMONDSON, R. J.; MONAGHAN, J. M.; DAVIES, B. R. The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. **Br. J. Cancer**, v. 86, n. 6, p. 879-885, Mar 2002.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol. Aspects Med.**, v. 29, n. 5, p. 258-289, Oct 2008.

EL-ALFY, M. et al. Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1481-1491, Mar 1999.

ESPEY, L. L. et al. Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. **Biol. Reprod.**, v. 62, n. 4, p. 1090-1095, Apr 2000.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J. Cell. Sci.**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195-4200, Dec 2010.

FREITAS, V. M. et al. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. **Mol. Cancer**, v. 12, p. 230-241, 2013.

FUSHIMI, K. et al. Functional differences of the catalytic and non-catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 11, p. 6706-6716, Mar 2008.

GAMBACCIANI, M. et al. Hormone replacement therapy and endometrial, ovarian and colorectal cancer. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 17, n. 1, p. 139-147, Mar 2003.

GATES, M. A. et al. Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. **Am. J. Epidemiol.**, v. 171, n. 1, p. 45-53, Jan 2010.

GENDRON, C. et al. Proteolytic activities of human ADAMTS-5 - comparative studies with ADAMTS-4. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 25, p. 18294-18306, Jun 2007.

GERDES, M. J. et al. Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. **Front. Oncol.**, v. 4, p. 366, 2014.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, Oct 2003.

GORDON, M. S.; MENDELSON, D. S.; KATO, G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. **Int. J. Cancer.**, v. 126, n. 8, p. 1777-1787, Apr 2010.

GRASSO, G.; BONNET, S. Metal complexes and metalloproteases - targeting conformational diseases. **Metallomics**, v. 6, n. 8, p. 1346-1357, Jul 2014.

GREER, J. B. et al. Androgenic progestins in oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. **Obstet. Gynecol.**, v. 105, n. 4, p. 731-740, Apr 2005.

GREISER, C. M.; GREISER, E. M.; DÖREN, M. Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer - systematic review and meta-analysis. **Hum. Reprod. Update.**, v. 13, n. 5, p. 453-463, 2007 Sep-Oct 2007.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 810 p.

HALON, A. et al. Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 17, n. 3, p. 511-518, Sep 2011.

HAMILTON, T. C. et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH - OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. **Cancer Res.**, v. 43, n. 11, p. 5379-5389, Nov 1983.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000.

_____. Hallmarks of cancer - the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene - from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1187-1198, Jun 1996.

HASHIMOTO, T. et al. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. **Stroke**, v. 34, n. 4, p. 925-931, Apr 2003.

HAWKINS, S. M.; MATZUK, M. M. The menstrual cycle - basic biology. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1135, p. 10-18, 2008.

HELD-FEINDT, J. et al. Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. **Int. J. Cancer**, v. 118, n. 1, p. 55-61, Jan 2006.

HELZLSOUER, K. J. et al. Serum gonadotropins and steroid hormones and the development of ovarian cancer. **JAMA**, v. 274, n. 24, p. 1926-1930, Dec 1995.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, Oct 2000.

HO, S. M. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 1, p. 73, Oct 2003.

HSU, Y. P. et al. Anti-angiogenic properties of ADAMTS-4 in vitro. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 93, n. 1, p. 70-77, Feb 2012.

HUA, H. et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis - an evolving paradigm. **Cell .Mol. Life Sci.**, v. 68, n. 23, p. 3853-3868, Dec 2011.

HUIJBERS, I. J. et al. A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. 9808-9820, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA,2014. 124 p.

IRUELA-ARISPE, M. L.; CARPIZO, D.; LUQUE, A. ADAMTS1 - a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 995, p. 183-190, May 2003.

JANUCHOWSKI, R. et al. Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, p. 365-369, 2014.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **C.A. Cancer. J. Clin.**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011 Mar-Apr 2011.

JEPPSSON, S.; RANNEVIK, G.; THORELL, J. I. Pituitary gonadotrophin secretion during the first weeks of pregnancy. **Acta. Endocrinol. (Copenh)**, v. 85, n. 1, p. 177-188, May 1977.

JONES, R. D.; HUGH JONES, T.; CHANNER, K. S. The influence of testosterone upon vascular reactivity. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 151, n. 1, p. 29-37, Jul 2004.

JOSHI, P. A.; DI GRAPPA, M. A.; KHOKHA, R. Active allies - hormones, stem cells and the niche in adult mammapoiesis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 23, n. 6, p. 299-309, Jun 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2013. 556 p.

KALLURI, R. Basement membranes - structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, n. 6, p. 422-433, Jun 2003.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, May 2006.

KARAGIANNIS, E. D.; POPEL, A. S. Anti-angiogenic peptides identified in thrombospondin type I domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 359, n. 1, p. 63-69, Jul 2007.

KAUPPILA, S. et al. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. **J. Pathol.**, v. 186, n. 3, p. 262-268, Nov 1998.

KENNY, H. A. et al. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1367-1379, Apr 2008.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases - regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr 2010.

KUMAR, S.; RAO, N.; GE, R. Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer. **Cancers Basel**, v. 4, n. 4, p. 1252-1299, 2012.

KUNO, K. et al. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 1, p. 556-562, Jan 1997.

_____. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. **F.E.B.S .Lett.**, v. 478, n. 3, p. 241-245, Aug 2000.

KWOK, A. L. et al. Caution over use of ES2 as a model of ovarian clear cell carcinoma. **J. Clin. Pathol.**, v. 67, n. 10, p. 921-922, Oct 2014.

LABAT-ROBERT, J. Cell-Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. **Pathol. Biol.(Paris)**, v. 60, n. 1, p. 15-19, Feb 2012.

LACEY, J. V. et al. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. **JAMA**, v. 288, n. 3, p. 334-341, Jul 2002.

LE GOFF, C.; CORMIER-DAIRE, V. The ADAMTS(L) family and human genetic disorders. **Hum Mol. Genet.**, v. 20, n. R2, p. 163-167, Oct 2011.

LEE, N. V. et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. **E.M.B.O. J.**, v. 25, n. 22, p. 5270-5283, Nov 2006.

LEE, P. et al. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 96, n. 3, p. 671-677, Mar 2005.

LEE, T. S. et al. Progesterone Inhibits Endothelial Cell Migration Through Suppression of the Rho Activity Mediated by cSrc Activation. **J. Cell. Biochem.**, v. 97, n. 4, p. 886-875, Mar 2015.

LENHARD, M. et al. Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer - progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival. **B.M.C. Cancer.**, v. 12, p. 553-559, 2012.

LILI, L. N. et al. Molecular profiling predicts the existence of two functionally distinct classes of ovarian cancer stroma. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 846-857, 2013.

LITWACK G.; TJ, S. **Manual de bioquímica com correlações clínicas.** São Paulo: Edgard Bliicher, 1998. 570 p.

LIU, Y. J.; XU, Y.; YU, Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. **Oncogene**, v. 25, n. 17, p. 2452-2467, Apr 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix - a dynamic niche in cancer progression. **J. Cell. Biol.**, v. 196, n. 4, p. 395-406, Feb 2012.

LUIZ, B. M. et al. Estudo epidemiológico de pacientes com tumor de ovário no município de Jundiaí no período de junho de 2001 a junho de 2006. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 55, p. 247-253 2009.

MAKIHIRA, S. et al. Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2480-2488, Jun 2003.

MASUI, T. et al. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, n. 11, p. 3437-3443, Nov 2001.

MATTHEWS, R. T. et al. Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 30, p. 22695-22703, Jul 2000.

MERDAD, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer - MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. **Anticancer Res.**, v. 34, n. 3, p. 1355-1366, Mar 2014.

MILES, R. R. et al. ADAMTS-1 - A cellular disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs is a target for parathyroid hormone in bone. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4533-4542, Dec 2000.

MINK, P. J. et al. Physical activity, waist-to-hip ratio, and other risk factors for ovarian cancer - a follow-up study of older women. **Epidemiology**, v. 7, n. 1, p. 38-45, Jan 1996.

MORLEY, J. E.; PERRY, H. M. Androgen treatment of male hypogonadism in older males. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 85, n. 2-5, p. 367-373, Jun 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759.

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta - identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Lett.**, v. 392, n. 1, p. 49-53, Aug 1996.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 11, p. 839-849, Nov 2004.

MØRCH, L. S. et al. Hormone therapy and ovarian cancer. **JAMA**, v. 302, n. 3, p. 298-305, Jul 2009.

NAGASE, H.; KASHIWAGI, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. **Arthritis Res. Ther**, v. 5, n. 2, p. 94-103, 2003.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, Jul 1999. ISSN 0021-9258.

NAITO, S. et al. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. **Pathol. Int.**, v. 57, n. 11, p. 703-711, Nov 2007.

NASSER, N. J. Heparanase involvement in physiology and disease. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 11, p. 1706-1715, Jun 2008.

NESS, R. B. Endometriosis and ovarian cancer - thoughts on shared pathophysiology. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 189, n. 1, p. 280-294, Jul 2003.

NIEWIAROWSKI, S. et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin. Hematol.**, v. 31, n. 4, p. 289-300, Oct 1994.

OBIKA, M. et al. Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. **Cancer Sci.**, v. 103, n. 10, p. 1889-1897, Oct 2012.

OHNISHI, J. et al. Functions for proteinases in the ovulatory process. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1751, n. 1, p. 95-109, Aug 2005.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, n. 3, p. 221-233, Mar 2007.

PARAMESWARAN, K. et al. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 44, n. 1, p. 139-146, 2006.

PARK, S. H. et al. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, n. 9, p. 2085-2098, Sep 2008.

PEARCE, C. L. et al. Increased ovarian cancer risk associated with menopausal estrogen therapy is reduced by adding a progestin. **Cancer**, v. 115, n. 3, p. 531-519, Feb 2009.

PETERS, H.; MCNATTY, K. P. **The ovary**. Barkeley e Los Angeles: University of California, 1980. 654 p.

PICTON, H. M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703-715, Dec 2008.

PORTER, S. et al. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem. J.**, v. 386, n. Pt 1, p. 15-27, Feb 2005.

_____. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 7, p. 2429-2440, Apr 2004.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family - surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet.**, v. 16, n. 2, p. 83-87, Feb 2000.

PRZEMYSŁAW, L. et al. ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. **BMB Rep**, v. 46, n. 3, p. 139-50, Mar 2013.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol**, v. 26, n. 8, p. 587-596, Oct 2007.

RAMACHANDRAN, B. E. A. Novel insights on imaging sex-hormone dependent 1 tumourigenesis in vivo. . **Endocr. Relat. Cancer**, p. 21-32, 2011.

RAO, N. et al. ADAMTS4 and its proteolytic fragments differentially affect melanoma growth and angiogenesis in mice. **Int. J. Cancer**, v. 133, n. 2, p. 294-306, Jul 2013.

RAYNAUD, C. M. et al. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 33, n. 4, p. 341-345, Aug 2010.

REHN, A. P. et al. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. **Bone**, v. 41, n. 2, p. 231-238, Aug 2007.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases - physiological and cellular functions. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 20, n. 2, p. 126-137, Apr 2009.

RICCI, M. D. et al. **Ginecologia oncológica - aspectos atuais do diagnóstico e tratamento**. Barueri: Manole, 2008. 357 p.

RICCIARDELLI, C. et al. The ADAMTS1 protease gene is required for mammary tumor growth and metastasis. **Am. J. Pathol.**, v. 179, n. 6, p. 3075-3085, Dec 2011.

RICCIARDELLI, C.; RODGERS, R. J. Extracellular matrix of ovarian tumors. **Semin. Reprod. Med.**, v. 24, n. 4, p. 270-282, Sep 2006.

RICHARDS, J. S. et al. Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes - evidence for specific and redundant patterns during ovulation. **Biol. Reprod.**, v. 72, n. 5, p. 1241-1255, May 2005.

RIMAN, T. et al. Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer - results from a Swedish case-control study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 156, n. 4, p. 363-373, Aug 2002.

RIMAN, T.; NILSSON, S.; PERSSON, I. R. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 83, n. 9, p. 783-795, Sep 2004.

RISTOW, C. M.; YAMAMOTO, C. T.; FAVARO, M. Fatores de risco e patogênese das neoplasias malignas epiteliais de ovário - revisão de literatura. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, p. 185-195. , 2006.

ROBKER, R. L. et al. Progesterone-regulated genes in the ovulation process - ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 9, p. 4689-4694, Apr 2000.

ROCKS, N. et al. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochimie**, v. 90, n. 2, p. 369-379, Feb 2008.

_____. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. **Cancer Res.**, v. 68, n. 22, p. 9541-9550, Nov 2008.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; VAN WEZEL, I. L. Extracellular matrix in ovarian follicles. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 163, n. 1-2, p. 73-79, May 2000.

RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C. et al. Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. **Int. J. Biochem. Cell. Bio.**, v. 41, n. 4, p. 800-810, Apr 2009.

_____. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 293, n. 1, p. 501-508, Apr 2002.

ROMANO, A. et al. Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 101, n. 2, p. 287-295, May 2006.

ROZANOV, D. V. et al. Aberrant, persistent inclusion into lipid rafts limits the tumorigenic function of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignant cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 293, n. 1, p. 81-95, Feb 2004.

RUSSELL, D. L. et al. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 43, p. 42330-42335, Oct 2003.

SALANI, R. et al. Expression of extracellular matrix proteins in ovarian serous tumors. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 26, n. 2, p. 141-146, Apr 2007.

SANDY, J. D. et al. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 16, p. 13372-13378, Apr 2001.

SAPOZNIK, S. et al. Gonadotropin-regulated lymphangiogenesis in ovarian cancer is mediated by LEDGF-induced expression of VEGF-C. **Cancer Res.**, v. 69, n. 24, p. 9306-9314, Dec 2009.

SARKAR, N. N. The potential of mifepristone (RU486) as a female contraceptive drug. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 56, n. 2, p. 140-144, Mar 2002.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, n. 1-2, p. 53-65, Jul 2002.

SCHILDKRAUT, J. M. et al. Impact of progestin and estrogen potency in oral contraceptives on ovarian cancer risk. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 94, n. 1, p. 32-38, Jan 2002.

SCHOCK, H. et al. Early pregnancy sex steroids and maternal risk of epithelial ovarian cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 21, n. 6, p. 831-844, 2014.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases - multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev.**, v. 17, n. 1, p. 7-30, Jan 2003.

SHIMADA, M. et al. Down-regulated expression of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeats-1 by progesterone receptor antagonist is associated with impaired expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4603-4614, Oct 2004.

SHINDO, T. et al. ADAMTS-1 - a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 10, p. 1345-1352, May 2000.

SHOZU, M. et al. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 35, n. 2, p. 343-355, Oct 2005.

SI-YAYEB, K. et al. Unexpected localization of the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) within the cell nucleus in liver cancer cells. Mechanisms and consequences - **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 330-340, 2003.

SINHA-HIKIM, I. et al. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 8, p. 3024-3033, Aug 2006.

SONG, J. et al. Estradiol-induced ezrin overexpression in ovarian cancer - a new signaling domain for estrogen. **Cancer Lett.**, v. 220, n. 1, p. 57-65, Mar 2005.

STANTON, H. et al. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1812, n. 12, p. 1616-1629, Dec 2011.

SYED, V. et al. Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. **Cancer Res.**, v. 61, n. 18, p. 6768-6776, Sep 2001.

TAN, I. E. A.; RICCIARDELLI, C.; RUSSELL, D. L. The metalloproteinase ADAMTS1 - a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. **Int. J. Cancer**, v. 133, n. 10, p. 2263-2276, Nov 2013.

TAUCHI, R. et al. The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. **J. Neuroinflamm.**, v. 9, p. 53, 2012.

TIVESTEN, A. et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, n. 11, p. 1833-1839, Nov 2004.

TORTORELLA, M. D. et al. Purification and cloning of aggrecanase-1 - a member of the ADAMTS family of proteins. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1664-1666, Jun 1999.

_____. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. **Curr. Pharm. Des.**, v. 15, n. 20, p. 2359-2374, 2009.

TUNG, K. H. et al. Reproductive factors and epithelial ovarian cancer risk by histologic type - a multiethnic case-control study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 158, n. 7, p. 629-638, Oct 2003.

TYAN, S. W. et al. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to secrete ADAMTS1 for cancer invasion through an epigenetic change. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35128, 2012.

VAN STAVEREN, W. C. et al. Human cancer cell lines - Experimental models for cancer cells in situ for cancer stem cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1795, n. 2, p. 92-103, Apr 2009.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v. 92, n. 8, p. 827-839, May 2003.

VOIGT, L. F. et al. Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. **Lancet**, v. 338, n. 8762, p. 274-277, Aug 1991.

VÁZQUEZ, F. et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 23349-23357, Aug 1999.

WANG, W. M. et al. Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 21, p. 19549-19557, May 2003.

WEEN, M. P.; OEHLER, M. K.; RICCIARDELLI, C. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, n. 2, p. 1009-10029, 2011.

WEN, J. Regulated expression of aggrecanases of adamts family in endometrial physiology and pathology. (Doctor of Philosophy - PhD). **Reproductive and Developmental Sciences**, University of British Columbia, p. 149, 2010.

WESTLING, J. et al. ADAMTS4 cleaves at the aggrecanase site (Glu373-Ala374) and secondarily at the matrix metalloproteinase site (Asn341-Phe342) in the aggrecan interglobular domain. **J Bio.l Chem.**, v. 277, n. 18, p. 16059-16066, May 2002.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. **Reprod. Sci.**, v. 14, n. 8 Suppl, p. 6-10, Dec 2007.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F.; CURRIE, A. R. Cell death - the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.