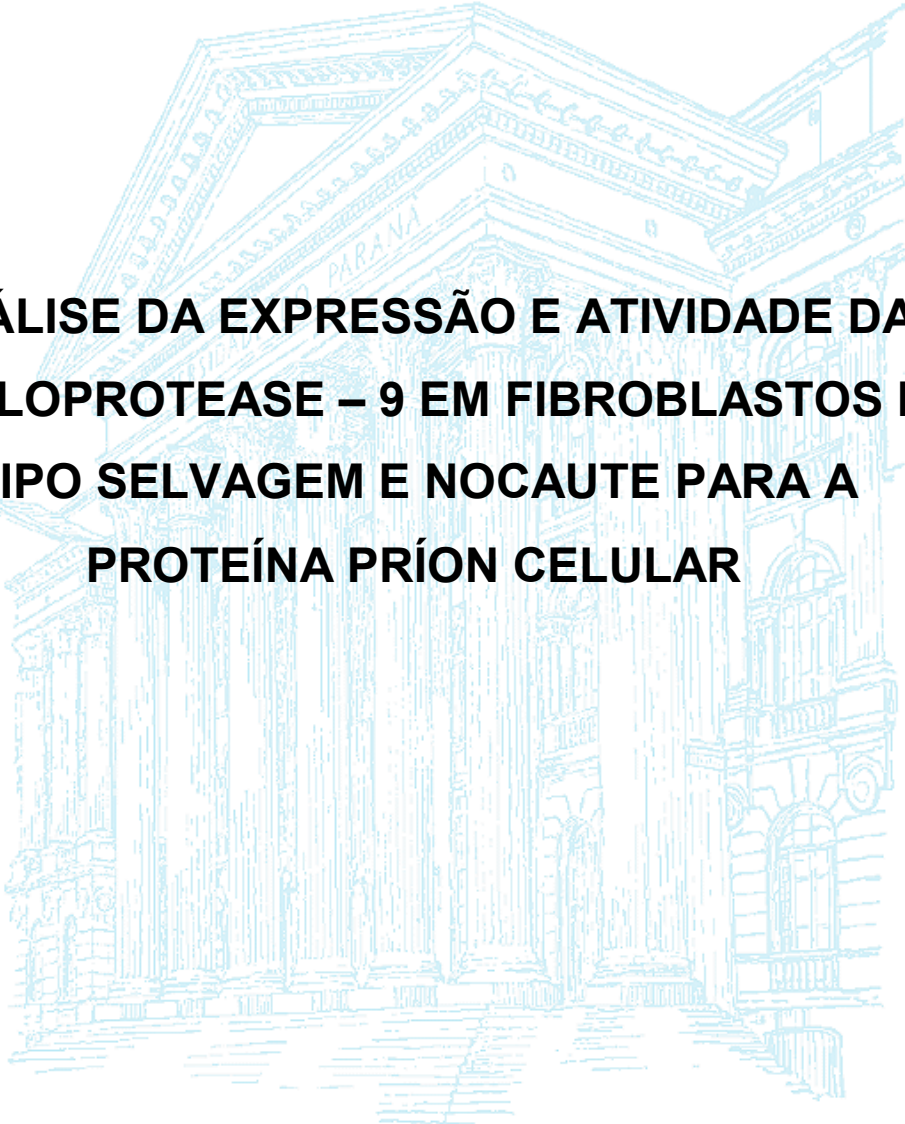


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SOFIA ISABEL RIBEIRO PEREIRA



**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA
METALOPROTEASE – 9 EM FIBROBLASTOS DO
TIPO SELVAGEM E NOCAUTE PARA A
PROTEÍNA PRÍON CELULAR**

CURITIBA

2011

SOFIA ISABEL RIBEIRO PEREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA
METALOPROTEASE – 9 EM FIBROBLASTOS DO
TIPO SELVAGEM E NOCAUTE PARA A
PROTEÍNA PRÍON CELULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata.

CURITIBA

2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dra. Enilze Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Luciano Huergo
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após argüir a mestranda **Sofia Isabel Ribeiro Pereira**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Análise da expressão e atividade da metaloprotease-9 em fibroblastos do tipo selvagem e nocaute para a proteína príon celular" são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de fevereiro de 2011



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

À Isabel

AGRADECIMENTOS

Ao professor Sílvio Zanata, que tem sido para mim muito mais do que apenas um orientador. Obrigada por me ajudar, dentro e fora do laboratório. Obrigada por impregnar ainda mais em mim a paixão pela Ciência, sua história, evolução e até mesmo seus bastidores. Apesar de frequentemente fugirem ao tema inicial, as nossas discussões científicas sempre foram, no mínimo, divertidas. Obrigada por confiar em mim, por exigir sempre mais, por não me deixar abater por resultados paradoxais (leia-se “absurdos”). Levarei o que você me ensinou para onde quer que eu vá.

À Michele, pelo tempo, paciência e competência que dispôs para me ensinar desde que entrei no laboratório. Não consigo imaginar uma tutora melhor! Obrigada por ser um exemplo para mim, obrigada pela amizade e pela força nos momentos mais difíceis, quando nada dá certo, mas também por compartilhar a alegria das pequenas conquistas.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia, em especial ao Max, Axel e Celso, que me ajudaram com a Biologia Molecular, ao Breno pela ajuda com as citometrias, à Gabi e Carol que me deram uma mãozinha sempre que necessário; Agradeço também aos amigos Michele, Luíz, Max, Gabi, Carol, Sílvinha, Patrícia, Luciano e Rodrigo, por fazerem com que o dia-a-dia do laboratório fosse mais divertido e agradável.

À banca, pelos comentários pertinentes e críticas construtivas.

Ao Thiago Jacomasso, pela ajuda inestimável com os experimentos de qPCR e aos alunos do LME pelas inúmeras vezes que me deixaram usar o espectrofotômetro.

Às professoras Adriana Mercadante e Lia Nakao, pela sua contribuição para a minha formação científica.

Às amigas Honislaine e Martha por me acompanharem e apoiarem por todo este tempo.

Ao Denilson, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e apoio incondicional.

À Isabel e à Hermínia, pelo incentivo, por acreditarem em mim, por me fazerem sempre querer chegar mais longe.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“Não basta examinar; é necessário contemplar: impregnemos de emoção e simpatia as coisas observadas; Façamo-las nossas, tanto pelo coração como pela inteligência. Só assim nos entregarão o seu segredo.”

Santiago Ramón y Cajal

RESUMO

A proteína príon celular (PrP^C) é uma proteína de membrana ancorada por glicosilfosfatidilinositol de distribuição ubíqua. Embora se saiba que a sua isoforma anormal scrapie (PrP^{Sc}) é o agente etiológico das encefalopatias espongiformes transmissíveis, a função fisiológica de PrP^C permanece em debate. Dados na literatura sugerem que as funções de PrP^C incluem sobrevivência neuronal, neuroproteção, formação e manutenção de sinapses, atividade anti-oxidante e anti-apoptótica, participação em processos imunológicos e nos fenômenos de adesão celular, invasão e metástase de células tumorais. Sabe-se que PrP^C interage com uma ampla gama de ligantes, como as proteínas da matriz extracelular (MEC) laminina e vitronectina. A disposição destas e outras proteínas de MEC é constantemente remodelada por uma família de enzimas proteolíticas conhecidas como Metaloproteases de Matriz (MMPs). Entre as MMPs, a MMP-9 tem recebido especial atenção na literatura devido à sua participação nos processos de aprendizado e memória, neuroplasticidade, neuroproteção, resposta imune, adesão célula-matriz, migração, invasão e metástase de células tumorais. O objetivo deste trabalho é investigar uma possível relação funcional entre a proteína príon celular e a metaloprotease 9, duas proteínas que são expressas nos mesmos tipos celulares e participam dos mesmos processos fisiopatológicos. Para isso, analisamos a expressão e atividade de MMP-9 em células tipo selvagem e nocaute para PrP^C. Não foi encontrada uma diferença significativa entre a expressão ou atividade gelatinolítica da MMP-9 entre as duas linhagens celulares. Analisamos então o efeito da superexpressão de PrP^C em células HEK 293T sobre a secreção de MMP-9. Os resultados que obtivemos sugerem que superexpressão de PrP^C não altera a atividade de MMP-9 em HEK 293T. Por último, a expressão de *PRNP* foi silenciada em células de tumor de mama MDA-MB-435 com RNA de interferência para e a expressão gênica de MMP-9 analisada. Os dados obtidos indicam que silenciamento do gene que codifica PrP^C em células tumorais MDA-MB-435 não altera a expressão gênica de MMP-9. Concluindo, nos modelos experimentais utilizados neste trabalho, a expressão e atividade gelatinolítica de MMP-9 parece ser independente da proteína príon celular.

Palavras-chave: Fibroblastos Nocaute, Metaloprotease de Matriz-9, Proteína Príon Celular;

ABSTRACT

The cellular prion protein (PrP^C) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein of ubiquitous distribution. Although it is known that its abnormal isoform scrapie (PrP^{Sc}) is the ethiological agent of transmissible spongiform encephalopathies, the physiological function of PrP^C is still under debate. Data in the literature suggest that PrP^C functions include neuronal survival, neuroprotection, formation and maintenance of synapses, antioxidant and antiapoptotic-activity, participation in immunological processes and in cell adhesion, invasion and metastasis of tumor cells phenomena. It is known that PrP^C interacts with a wide range of ligands, such as the extracellular matrix (ECM) proteins laminin and vitronectin. The arrangement of these and other ECM proteins is constantly remodeled by a family of proteolytic enzymes known as Matrix Metalloproteinases (MMPs). Among the MMPs, MMP-9 has received special attention in the literature due to its participation in learning and memory processes, neuroplasticity, neuroprotection, immune response, cell-matrix adhesion, migration, invasion and metastasis of tumor cell. The aim of this study is to investigate a possible functional relationship between the cellular prion protein and metalloprotease-9, two proteins that are expressed in the same cell types and participate in the same physiopathological processes. In order to do that, we analysed MMP-9 expression and activity in PrP^C wild type and knockout cells. A significant difference between the two cell lines in MMP-9 expression or gelatinolytic activity was not found. Then we analysed the effect of PrP^C overexpression in MMP-9 secretion in HEK 293T cell. Our results suggest that MMP-9 activity is not altered by PrP^C overexpression in HEK 293T cells. Finally, *PRNP* expression was silenced in MDA-MB-435 breast cancer cells with interfering RNA and the MMP-9 gene expression was analysed. Our data indicate that MMP-9 gene expression is not altered by PrP^C encoding gene silencing in MDA-MB 435 tumor cells. In conclusion, in the experimental models used in this study, MMP-9 expression and gelatinolytic activity seems to be independent of PrP^C.

Key Words: Knockout Fibroblasts, Matrix Metalloproteinase-9, Cellular Prion Protein;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR.....	18
FIGURA 2 - VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR.....	22
FIGURA 3 - ATIVIDADE NEUROTROFICA DE PrP ^C E SEUS LIGANTES.....	25
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA GERAL E CLASSIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS MMPS.....	31
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO PROTEOLÍTICA E QUÍMICA DAS MMPS.....	37
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DE MMP-2 NA MEMBRANA CELULAR POR TIMP-2 E MT-MMP.....	39
FIGURA 7 - FUNÇÃO DA MMPS NA PROGRESSÃO TUMORAL.....	49
FIGURA 8 - CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE MEF QUANTO À EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	62
FIGURA 9 - PrP ^C NÃO INFLUENCIA A EXPRESSÃO DE MMP-9 EM CÉLULAS MEF.....	63
FIGURA 10 - A PRESENÇA DE FIBRONECTINA OU VITRONECTINA NÃO ALTERA A ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE CÉLULAS MEF.....	65
FIGURA 11 - PRÓ-MMP-9 HUMANA É CORRETAMENTE EXPRESSA EM CÉLULAS HEK 293T E TEM ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	67
FIGURA 12 - PrP ^C NÃO PARTICIPA DA ATIVAÇÃO DE MMP-9 EM CÉLULAS MEF.....	68
FIGURA 13 - PrP ^C NÃO INFLUÊNCIA ADESÃO CÉLULA-MATRIZ EM MEFs.....	70
FIGURA 14 – A ATIVIDADE DE MMP-9 É INDEPENDENTE DA EXPRESSÃO DE PrP ^C 3F4 EM CÉLULAS HEK 293T.....	72
FIGURA 15 – CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PrP ^C EM CÉLULAS MDA-MB-435.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROTEÍNAS LIGANTES DE PrP ^C	23
TABELA 2 - SUBSTRATOS DAS PRINCIPAIS MMPS.....	35
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE TIMPS.....	44
TABELA 4 - LISTA DE PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	57
TABELA 5 - SEQUÊNCIA DO DUPLEX DE RNA PARA SILENCIAMENTO DO GENE <i>PRNP</i> QUE CODIFICA PrP ^C	59
TABELA 6 - SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS.....	60
TABELA 7 - EFICIÊNCIA DO DUPLEX PARA INTERFERÊNCIA DO GENE <i>PRNP</i> QUE CODIFICA PrP ^C	75
TABELA 8 - EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-9 APÓS INTERFERÊNCIA DO GENE <i>PRNP</i> QUE CODIFICA PrP ^C	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	–	Análise de variância
BES	–	ácido N,N-Bis(2-hidroxiethyl)-2-aminoetanosulfônico
BSA	–	albumina sérica bovina
cDNA	–	DNA complementar
dNTP	–	desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetracético
EFG	–	Fator de crescimento epidermal
ERK	–	<i>External signal-regulated kinase</i>
FGF	–	Fator de crescimento de fibroblasto
GFP	–	<i>green fluorescent protein</i>
GPI	–	glicosilfosfatidilinositol
HPRT	–	Hipoxantina-uanina fosforibosil transferase
HRP	–	peroxidase de raiz forte
IgG	–	Imunoglobulina do tipo G
kDa	–	quilodalton
MMPs	–	Metaloproteases de Matriz
mRNA	–	RNA mensageiro
OPD	–	<i>o</i> -phenylenediamine
PAGE	–	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	–	pares de bases
PBS	–	solução salina tamponada com fosfato
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	–	Fluoreto de Fenilmetanosulfonila
<i>PRNP</i>	–	Gene que codifica a proteína príon celular humana
<i>Prnp</i>	–	Gene que codifica a proteína príon celular murina
PrP ^C	–	Proteína Príon Celular
RNAi	–	RNA de interferência
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SFB	–	Soro Fetal Bovino
TBST	–	Solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
Tris	–	Tris (hidroximetil) amino metano
VEGF	–	Fator de crescimento do endotélio vascular
WB	–	<i>Western blotting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 PROTEÍNA PRÍON CELULAR	17
2.1.1 PrP ^C e PrP ^{Sc}	17
2.1.2 Expressão e Estrutura de PrP ^C	18
2.1.3 Endocitose de PrP ^C	20
2.1.4 Função de PrP ^C	23
2.1.4.1 PrP ^C no SNC	24
2.1.4.2 PrP ^C e Câncer	26
2.2 METALOPROTEASES DE MATRIZ.....	29
2.2.1 Classificação das MMPs.....	29
2.2.2 Estrutura das MMPs	31
2.2.3 A MEC e os Substratos das MMPs.....	34
2.2.4 Regulação de MMPs	36
2.2.4.1 Regulação Transcricional e Pós -Transcricional de MMPs	37
2.2.4.2 Regulação Pós-Traducional de MMPs.....	38
2.2.5 Evolução das MMPs.....	42
2.3 INIBIDORES TECIDUAIS DE MMPS	44
2.3.1 Estrutura e aspectos gerais	44
2.3.2 TIMPs como proteínas multifuncionais	45
2.4 GELATINASES, TIMPs E O SNC.....	46
2.5 GELATINASES, TIMPs E CÂNCER	49
3. OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 CULTURA CELULAR.....	53
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MEF QUANTO À EXPRESSÃO DE PrP ^C POR IMUNOFLORESCÊNCIA	53
4.3 OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS.....	54
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MMPS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	54
4.5 EFEITO DE PROTEÍNAS DE MATRIZ SOBRE A SECREÇÃO DE MMPS	55
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS POR ENSAIO BASEADO EM MICROPLACAS UTILIZANDO GELATINA BIOTINILADA	55
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS POR ZIMOGRÁFIA.....	56
4.8 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	57
4.9 SUPEREXPRESSION DE PRÓ-MMP-9 EM CÉLULAS HEK 293T	57
4.10 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE PrP ^C NA ATIVAÇÃO DE PRÓ-MMP-9	58
4.11 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MDA-MB-435 QUANTO À EXPRESSÃO DE PrP ^C POR IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	59
4.12 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MDA-MB-435 QUANTO À EXPRESSÃO DE PrP ^C POR CITOMETRIA DE FLUXO	59
4.13 SILENCIAMENTO DO GENE <i>PRNP</i> ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE INTERFERÊNCIA DE RNA (iRNA)	60
4.14 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-9 EM CÉLULAS MDA- MB-435 SILENCIADAS PARA O GENE <i>PRNP</i> QUE CODIFICA PrP ^C	60
4.14.1 Extração de RNA total da linhagem MDA-MB-435.....	60

4.14.2 RT- PCR.....	61
4.14.3 PCR em tempo real	61
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5. RESULTADOS	63
5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-9 EM CÉLULAS MEF SELVAGEM E NOCAUTE PARA A PROTEÍNA PRION CELULAR	63
5.2 EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE PrP ^C NA ATIVIDADE DE MMP-9 EXÓGENA EM CÉLULAS HEK 293T	72
5.3 EFEITO DO SILENCIAMENTO DO GENE <i>PRNP</i> QUE CODIFICA PrP ^C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-9	74
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

A célula é a unidade funcional que compõe os organismos. É o veículo da informação hereditária que define cada uma das mais de 10 milhões de espécies que habitam a Terra hoje. Tão impressionante quanto a diversidade dos seres vivos é a constância dos mecanismos fundamentais que regem o seu funcionamento (ALBERTS *et al.*, 2008).

Todas as células compartilham a mesma maquinaria para realizar as suas funções básicas. Todas as células utilizam proteínas como catalisadores dos processos químicos que ocorrem no seu interior. E todas as proteínas interagem com outras moléculas, o que define a sua função ou propriedade biológica (ALBERTS *et al.*, 2008).

O comportamento de uma célula e a comunicação com o microambiente ao seu redor é em grande parte mediado por interações entre proteínas. O estudo destas interações é, portanto, de fundamental importância para a compreensão do funcionamento da célula (ALBERTS *et al.*, 2008).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é investigar uma possível interação funcional entre duas proteínas: a proteína príon celular (PrP^C) e a metaloprotease de matriz -9 (MMP-9).

PrP^C é uma glicoproteína de membrana de distribuição ubíqua, mais conhecida pela sua isoforma anormal *scrapie* (PrP^{Sc}), o agente etiológico das encefalopatias espongiformes transmissíveis. O conceito de um “príon” tem fascinado cientistas e leigos durante décadas, alimentando discussões calorosas e estimulando atividade experimental intensa. Hoje, quase 100 anos depois da primeira descrição de uma doença priônica em humanos por Creutzfeldt em 1920 e Jakob em 1921, a função fisiológica da proteína príon celular ainda está em debate (AGUZZI *et al.*, 2008).

Face à lista de inúmeras possíveis funções atribuídas a esta proteína, provavelmente a proposta mais parcimoniosa é a que sugere que PrP^C providencia uma plataforma para a associação de complexos macromoleculares na superfície celular, a partir dos quais interações seletivas com diferentes ligantes e vias de sinalização transmembrana se traduzem em uma ampla gama de efeitos biológicos. Ou seja, PrP^C pode subsidiar a

montagem de agrupamentos de moléculas e desta forma propiciar sinalização para diferentes eventos, dependendo do estágio do desenvolvimento, do tipo celular, do nível de expressão de PrP^C ou de seus parceiros moleculares e da disponibilidade de ligantes no ambiente próximo às células-alvo (LINDEN *et al.*, 2008). A beleza desta hipótese é que ela sustenta e prevê o leque de diferentes funções atualmente atribuídas a PrP^C como neuroproteção, formação e manutenção de sinapses e fibras mielinizadas, atividade anti-oxidante e anti-apoptótica, participação em processos imunológicos e nos fenômenos de adesão celular, invasão e metástase de células tumorais (AGUZZI, 2008; LINDEN *et al.*, 2008; MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).

Sendo PrP^C uma proteína de superfície faz sentido cogitar que seja capaz de mediar interações entre as células e o ambiente que as envolve. Porém, os tecidos não são constituídos exclusivamente por células. Uma fração considerável do seu volume é espaço extracelular, o qual é ocupado por uma intrincada rede de macromoléculas conhecida como matriz extracelular (MEC) (MATRISIAN, 1992).

A MEC é sintetizada e secretada localmente e os seus principais constituintes podem ser classificados em duas classes de moléculas: proteínas fibrosas e glicosaminoglicanos/proteoglicanos. A MEC é particularmente abundante nos tecidos conjuntivos, onde a organização e proporção relativa dos seus constituintes irão definir as propriedades de cada tecido em particular (VU, 2001). Outra estrutura formada pela MEC é a lâmina basal, na qual assentam todos os tecidos epiteliais. No entanto a MEC não tem apenas uma função de sustentação, ela também regula processos celulares como sobrevivência, proliferação, diferenciação, adesão e migração (MATRISIAN, 1992; LETOURNEAU, 1994; McCAWLEY & MATRISIAN, 2001; VU, 2001; MOTT & WERB, 2004).

Assim, para manter o equilíbrio necessário ao funcionamento normal do organismo, as células necessitam de diversas estratégias para garantir um controle rigoroso do ambiente externo (STERNLICHT & WERB, 2001). Por exemplo, a célula dispõe de uma família de enzimas especializadas na degradação da MEC, as MMPs. Esta família possui mais de 20 proteases secretadas capazes de remodelar a arquitetura da matriz, através da clivagem dos seus principais componentes. No entanto, a sua atividade não se limita a

uma simples alteração física da matriz, uma vez que, ao clivar as proteínas que a constituem, as MMPs são capazes de expor domínios críticos e liberar peptídeos biologicamente ativos que direcionam o comportamento celular (VU, 2001; McCAWLEY & MATRISIAN, 2001; MOTT & WERB, 2004).

Entre as MMPs, a MMP-9 tem recebido especial atenção na literatura devido à sua importância no sistema nervoso central, no sistema imune e na progressão tumoral. Já foi descrita a sua participação em fenômenos tão diversos quanto aprendizado e memória, neuroplasticidade, neuroproteção, resposta imune, adesão célula-matriz, migração celular, invasão e metástase de células tumorais (STERNLICHT & WERB, 2001; COUSSENS *et al.*, 2002; DZWONEK *et al.*, 2004).

É neste contexto que surge o interesse em investigar uma possível relação funcional entre a proteína príon celular e a metaloprotease 9, duas proteínas que têm sido constantemente flagradas sendo expressas nos mesmos tecidos e participando dos mesmos processos fisiopatológicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEÍNA PRÍON CELULAR

2.1.1 PrP^C e PrP^{Sc}

Prions (PrP) são partículas infecciosas exclusivamente proteínicas que causam um grupo de doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais (PRUSINER, 1998).

As doenças priônicas são anatomo-patologicamente definidas como encefalopatias espongiiformes transmissíveis (TSEs) e podem ser de natureza genética, infecciosa ou esporádica. Apesar da sua prevalência ser relativamente baixa, atualmente ainda são incuráveis. Em humanos, as TSEs incluem a doença de Creutzfeldt-Jakob, a Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, kuru e Insônia Familiar Fatal. Os sintomas e sinais clínicos principais são disfunção cognitiva e motora. Histologicamente, as TSEs são caracterizadas por perda neuronal, gliose e formação de placas de agregados de PrP^{Sc} (PRUSINER, 1998; PRUSINER *et al.*, 1998).

Foi observado que animais nocauteados para o gene *PRNP* que codifica PrP^C são resistentes à infecção por PrP^{Sc} e portanto concluiu-se que para que a isoforma aberrante e patologias associadas se instalem, é indispensável a presença de PrP^C (BUELER *et al.*, 1993). Aparentemente, PrP^C é convertido na isoforma *scrapie* através de um processo pós-traducional durante o qual α -hélices adquirem conformação de folhas- β . Esta transição estrutural é acompanhada por modificações profundas das propriedades físico-químicas de PrP, como a solubilidade e susceptibilidade à digestão por proteases (PRUSINER, 1998).

Surgiram então duas teorias para explicar o mecanismo por trás da neurodegeneração observada nas prionopatias: a teoria do ganho de função de PrP^{Sc} e a teoria de perda de função de PrP^C. Atualmente existem evidências experimentais que suportam ambas as teorias, mas nenhuma foi definitivamente comprovada e tanto quanto se sabe, também não são mutuamente exclusivas (revisado por AGUZZI *et al.*, 2008; LINDEN *et al.*, 2008).

2.1.2 Expressão e Estrutura de PrP^C

PrP^C é uma sialoglicoproteína de membrana ancorada via glicosilfosfatidilinositol (GPI), de distribuição ubíqua (PRUSINER, 1998). É uma proteína altamente expressa no sistema nervoso central (SNC) maduro e em desenvolvimento, tanto por neurônios quanto por células da glia. PrP^C também é expresso em componentes do sistema imune (medula óssea, órgãos linfóides e células sanguíneas), no coração, pulmão, trato gastrointestinal, músculo, rim, fígado e glândula mamária (revisado por LINDEN *et al.*, 2008).

A sequência nucleotídica de *PRNP* foi altamente conservada durante a evolução em mamíferos. Genes similares a *PRNP* existem também em aves, reptéis, anfíbios e até mesmo em peixes (revisado por NICOLAS *et al.* 2009).

Em humanos, o gene *PRNP* está localizado na região 12/13 do cromossomo 20, juntamente com dois outros genes (*PRND* e *PRNT*) formando o *locus PRNP*. O gene *PRNP* compreende 20 kpb e é composto por 2 éxons. Transcrição do segundo éxon dá origem à proteína PrP^C completa. O gene *PRND* também é composto por 2 éxons e codifica uma proteína de 179 aa conhecida como Doppel, que é similar em estrutura e topologia com a proteína príon celular. O gene *PRNT* é expresso exclusivamente no testículo adulto e origina três transcritos diferentes por splicing alternativo, embora se acredite que não codifique uma proteína (MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).

Durante a sua biossíntese, PrP^C sofre várias modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico do peptídeo sinal (aa 1-22) no retículo endoplasmático, adição de cadeias de oligossacarídeos N-ligados, formação de uma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína 179 e 214 e ligação com a âncora de GPI (LINDEN *et al.*, 2008).

Estruturalmente, PrP^C é constituído por um domínio N-terminal flexível, um domínio C-terminal globular e uma região hidrofóbica entre os dois. O domínio N-terminal contém quatro repetições do octapeptídeo (OR) PHGGGWHQ e um agrupamento de aminoácidos carregados positivamente (*cluster* de carga). O domínio C-terminal contém três α -hélices (aa 144-154, 173-194 e 200-228), uma folha β -pregueada antiparalela formada por duas folhas β (aa 128-131 e 161-164) e a âncora de GPI (Figura 1) (revisado em MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).



Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da proteína príon celular. O peptídeo sinal (aa 1-22) é clivado no retículo endoplasmático para dar origem à proteína madura. O domínio N-terminal não estruturado inclui a região de repetição do octapeptídeo (aa 51 a 90) capaz de ligar íons cobre e o *cluster* de aminoácidos carregados positivamente (aa 95 a 110). Unindo os domínios N e C-terminais está a região hidrofóbica (aa 112 a 133). O domínio C-terminal inclui as 3 α – hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 3$) e 2 folhas- β ($\beta 1$ e $\beta 2$). É também aqui que se encontram os sítios de glicosilação (aa 183 e 199) e a ponte dissulfeto (aa 179 e 214). Por último estão os aa onde se insere a âncora de GPI (adaptado de MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).

Devido à ocupação variável dos resíduos de asparagina, formas não-mono- e di-glicosiladas de PrP^C podem ser encontradas simultaneamente na célula. A glicosilação parece ter um papel importante na conversão da proteína príon celular na isoforma *scrapie*, além de afetar o tráfego intracelular e interação com outras proteínas (revisado em ERMONVAL *et al.*, 2003).

Como outras proteínas de superfície, PrP^C pode sofrer duas clivagens endoproteolíticas distintas. A primeira, também conhecida como α -clivagem, ocorre entre os resíduos 110 e 111, levando à formação de um fragmento N-terminal solúvel (N1) e de um fragmento C-terminal ainda ancorado à membrana (C1) (MANGÉ *et al.*, 2004). Esta clivagem ocorre em um compartimento tardio da via de secreção (WALMSLEY *et al.*, 2008), é mediada pela ADAM-10 (A Desintegrin and Metalloprotease-10) (VINCENT *et al.*, 2001) e é estimulada por agonistas da proteína quinase C (VINCENT *et al.*, 2000). Curiosamente, agonistas da proteína quinase C (ésteres de forbol) também induzem expressão de MMPs (STERNLICHT & WERB, 2001). PrP^C também pode sofrer β -clivagem, um evento mediado por espécies reativas de oxigênio que dá origem a um fragmento C-terminal de 19 kDa (C2) e um fragmento N-terminal de 7 kDa (N2), clivado na região adjacente aos octapeptídeos (MANGÉ *et al.*, 2004; WATT *et al.*, 2005).

A proteína príon celular também podem sofrer *shedding*¹ da membrana plasmática. Parkyn e colaboradores (2004) descreveram dois mecanismos através dos quais a proteína príon celular é secretada para o meio de cultura de células de neuroblastoma humano SHSY5Y. Um deles é mediado por fosfolipases, que liberam a proteína da superfície celular ao clivar a âncora de GPI. O outro parece ser mediado por proteases, visto que é bloqueado por uma gama de inibidores de metaloproteases e é induzido por ésteres de forbol. A enzima responsável por esta atividade não foi identificada neste trabalho, mas provavelmente se trate de uma MMP ou uma ADAM proteoliticamente ativa (PARKYN *et al.*, 2004).

2.1.3 Endocitose de PrP^C

Como outras proteínas ancoradas por GPI, PrP^C pode ser encontrado em micro-domínios de membrana ricos em colesterol e glicoesfingolipídeos, conhecidos como *lipid rafts*² (TARABOULOS *et al.*, 1995). Sabe-se que PrP^C é constitutivamente internalizado, embora a rota através da qual isto ocorre ainda esteja em debate, uma vez que tanto endocitose via clatrina (revisado em HOOPER *et al.*, 2008) quanto via cavéolas (PETERS *et al.*, 2003) foi observada.

Shyng e colaboradores (1993) mostraram que PrP de galinha (chPrP), o homólogo ao PrP^C de mamíferos, cicla constitutivamente entre a superfície da célula e um compartimento endocítico em células do neuroblastoma murino N2a. No ano seguinte, este mesmo grupo mostrou por imunomarcção com partículas de ouro e microscopia eletrônica que a endocitose de chPrP ocorre via vesículas de clatrina, tanto em células N2a quanto em culturas primárias de neurônios e de células gliais de embriões de galinha em E11. Além disso, chPrP foi encontrado em vesículas de clatrina purificadas de cérebro de galinha adulta (SHYNG *et al.*, 1994).

Na sequência foi demonstrado que íons Cu²⁺ se ligam às histidinas dos octapeptídeos do domínio N-terminal de PrP^C (BROWN *et al.*, 1997) e induzem endocitose de chPrP em células N2a (PAULY & HARRIS, 1998). As moléculas

¹ *Shedding* – clivagem de proteínas de membrana e conseqüentemente sua liberação para o meio extracelular (Alberts *et al.*, 2008).

² *Lipid Rafts* (balsas lipídicas) – microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicoesfingolipídeos, insolúveis em Triton X-100 (Alberts *et al.*, 2008).

internalizadas são rapidamente recicladas para a superfície celular e como esperado, em mutantes com deleções N-terminais o efeito do Cu^{2+} foi praticamente abolido (PAULY & HARRIS, 1998). Estes dados foram confirmados posteriormente por Lee e colaboradores (2001) em células SN56 transfectadas com GFP-PrP^C e por Perera & Hooper em células SHSY5Y (2001).

A primeira demonstração de endocitose de PrP^C endógeno foi efetuada por Sunyach e colaboradores em 2003, em culturas primárias de neurônios sensoriais. Neste trabalho foi observado que PrP^C deixa os *lipid rafts* antes de ser endocitado via clatrina. Isto acontece porque a estrutura destes microdomínios de membrana não acomoda a curvatura necessária para a formação de vesículas de clatrina. Assim, é necessário um deslocamento lateral de PrP^C para fora dos *rafts* antes da sua internalização (SUNYACH *et al.*, 2003).

Estes dados foram confirmados por Taylor e colaboradores em 2005, que observaram não só internalização de PrP^C via clatrina como também perceberam que a ligação de íons cobre com o octapeptídeo é o evento responsável pela movimentação de PrP^C para fora dos *rafts*.

No entanto ainda restava um problema para explicar a internalização de PrP^C por esta via: a ligação com moléculas adaptadoras. Uma vez que PrP^C é uma proteína ancorada por GPI, não possui uma cauda citoplasmática para interação com as proteínas adaptadoras das vesículas de clatrina. Começou então a procura por uma proteína que pudesse se ligar a PrP^C e mediar essa interação. Assim, o receptor de laminina 37kDa/67kDa foi identificado como sendo responsável por 25 a 50 % do PrP^C internalizado, o que sugeriu o envolvimento de outras proteínas neste processo (GAUCZYNSKI *et al.*, 2001).

Mais tarde, a proteína relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade -1 (LRP-1) foi identificada, simultaneamente, por dois grupos de pesquisa independentes como sendo responsável por essa função (TAYLOR & HOOPER, 2007; PARKYN *et al.*, 2008). Taylor e Hooper mostraram que LRP-1 é necessária para a endocitose induzida por Cu^{2+} em células de neuroblastoma humano SHSY5Y transfectadas com PrP, por imunofluorescência e ensaios de biotilação. Já Parkyn e colaboradores mostraram o envolvimento de LRP-1 não só na internalização, mas também no

tráfego biossintético de PrP^C endógeno em culturas primárias de neurônios sensoriais.

Por outro lado, evidências de outros laboratórios sugerem que PrP^C seja internalizado não via clatrina mas sim via cavéolas, microdomínios de membrana ricos em caveolina e associados a *lipid rafts* (VEY *et al.*, 1996; PETERS *et al.*, 2003). O estudo conduzido pelo laureado com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1997 Stanley B. Prusiner analisou a localização e internalização de PrP^C através de microscopia eletrônica na linhagem de células de ovário de hamster CHO. Inicialmente, células vivas foram incubadas com a proteína A marcada com partículas de ouro. Então foi observado que estes complexos (PrP^C/ Proteína A-ouro) foram entregues por uma via não-clássica para endossomos iniciais contendo cavéolas e daí para endossomos tardios e lisossomos (PETERS *et al.*, 2003).

No entanto, como células neuronais não expressam caveolina nem apresentam cavéolas morfologicamente distinguíveis, o significado destas observações no SNC, onde PrP^C é predominantemente expresso e exerce suas principais funções, permanece obscuro (HOOPER *et al.*, 2008).

Ainda assim, apesar de parecerem contraditórios, os dois mecanismos podem ser igualmente importantes, uma vez que internalização de um mesmo ligante por diferentes vias pode resultar em eventos de sinalização distintos. Por exemplo, o receptor de TGF- β é degradado após endocitose via cavéolas, enquanto que a internalização via clatrina dispara a sinalização por ele mediada (DI GUGLIELMO *et al.*, 2003).

Os mecanismos de endocitose de PrP^C aqui descritos estão esquematizados na figura 2.

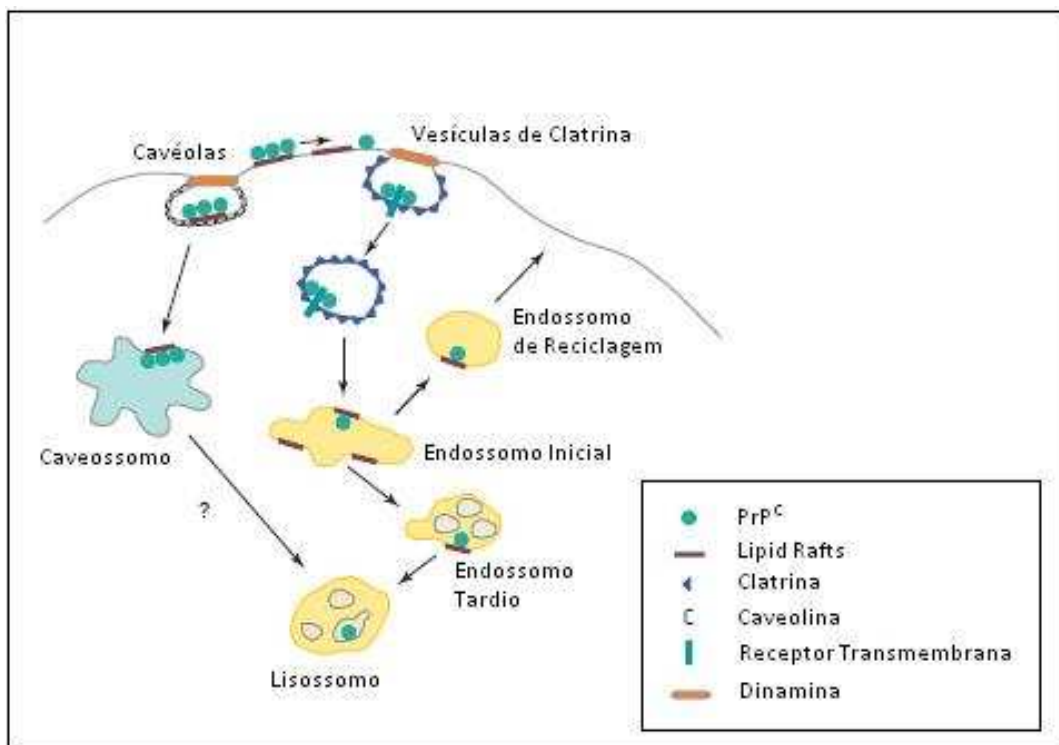


Figura 2 – Vias de Internalização da Proteína Prion Celular PrP^C é constitutivamente internalizado e a sua endocitose para ser aumentada por íons cobre (não mostrado). Em neurônios, a principal via de endocitose parece ser dependente de vesículas de clatrina. Após deslocamento lateral para fora dos rafts, PrP^C deve se ligar a uma proteína transmembrana e ser internalizado, podendo retornar rapidamente à superfície via endossomos de reciclagem ou seguir para degradação em lisossomos. Em células CHO, PrP^C pode ser endocitado via cavéolas (adaptado de Campana *et al.*, 2005).

2.1.4 Função de PrP^C

Em 2008, Rafael Linden e colaboradores publicaram uma proposta para explicar o grande número de funções atribuídas a PrP^C, em tipos celulares tão diversos, através de interação com tantos ligantes diferentes, mediadas por tantas vias de sinalização. A hipótese sugere que PrP^C deve ser um elemento chave na montagem de módulos de sinalização na superfície celular, servindo como uma plataforma para o acoplamento de múltiplos componentes.

Atualmente, acumulam-se propostas para os eventos mediados por PrP^C, que vão desde participação em neuroproteção (ZANATA *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2002, LOPES *et al.*, 2005), tráfico de íons metálicos (PAULY & HARRIS, 1998), sinalização transmembrana (MOULLIET-RICHARD *et al.*, 2000) e stress oxidativo (BROWN, 2001) até adesão celular (MANGÉ *et al.*,

2002; GRANER *et al.*, 2000; SCHROCK *et al.*, 2008), invasão e metástase (MURAS *et al.*, 2009).

Abaixo estão resumidos os eventos mediados por PrP^C mais relevantes para este trabalho.

2.1.4.1 PrP^C no SNC

No SNC, PrP^C tem sido implicado na neuritogênese, diferenciação neuronal, neuroproteção, neuroexcitabilidade, stress oxidativo, transmissão sináptica, regulação do ritmo circadiano, olfato, formação de memória e função cognitiva (revisado em MARTINS *et al.*, 2010).

Estes eventos são desencadeados por interação de PrP^C com uma vasta gama de ligantes, entre os quais estão proteínas de matriz extracelular (laminina, vitronectina) e moléculas envolvidas na adesão celular (LRP/LR, NCAM, β -Distroglican, ADAM-23).

Na tabela 1 estão listadas algumas das proteína ligantes de PrP^C.

TABELA 1 – PROTEÍNAS LIGANTES DE PrP^C

Ligante	Função do Ligante
Laminina	Adesão Celular
LRP/LR	Adesão Celular
NCAM	Adesão Celular
Heparina/Heparan Sulfato	Adesão Celular
β – Distroglican	Adesão Celular
Vitronectina	Adesão Celular
ADAM-23	Adesão Celular
LRP1	Receptor de captura (<i>scavenger</i>)
Plasminogênio (Plasmina)	Proteólise da MEC e ativação de MMPs
nNOS	Produção de NO
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
STI-1	Co-chaperona

(adaptado de Mehrpour & Codogno 2009)

Por exemplo, a interação entre PrP^C e laminina em células PC-12 promove neuritogênese, adesão neuronal, extensão e manutenção de neuritos (GRANER *et al.*, 2000a ; GRANER *et al.*, 2000b). A ligação de PrP^C com a molécula de adesão celular neural (NCAM), descrita por Schimtt-Ulms e colaboradores em 2001, também promove neuritogênese, via ativação da proteína quinase Fyn (SANTUCCIONE *et al.*, 2005). Outro trabalho mostrou

que PrP^C também participa do processo de crescimento axonal, devido à sua capacidade de ligação com outra proteína de matriz: a vitronectina, mas não com fibronectina ou colágeno (HAJJ *et al.*, 2007). Em animais nocautes para PrP^C o crescimento axonal é promovido por um mecanismo compensatório que leva a um aumento da ativação de integrinas, os receptores clássicos de moléculas de matriz (HAJJ *et al.*, 2007).

Utilizando como modelo explantes de retina de ratos e camundongos neonatos, Chiarini e colaboradores (2002) mostraram que PrP^C protege neurônios de apoptose induzida por anisomicina, um inibidor da síntese protéica. Este efeito neuroprotetor é desencadeado pela interação entre PrP^C e a proteína STI-1 (ZANATA *et al.*, 2002). Mais tarde, o mesmo grupo mostrou que esta interação também promove neuritogênese em neurônios hipocampais (LOPES *et al.*, 2005).

A proteína príon celular também se mostrou hábil em proteger culturas primárias de neurônios hipocampais da excitotoxicidade induzida por ligação do neurotransmissor glutamato com o seu receptor ionotrópico NMDA. O mecanismo molecular que propicia este efeito neuroprotetor consiste na inibição da subunidade NR2D do receptor NMDA (KHOSRAVANI *et al.*, 2008).

Chen e colaboradores (2002) relataram que PrP^C promove sobrevivência neuronal e crescimento de neuritos em neurônios granulares do cerebelo de camundongos recém-nascidos.

Além disso, PrP^C também parece estar envolvido na comunicação entre neurônios e células da glia. A sua expressão em astrócitos é crítica para coordenação dos eventos de diferenciação e sobrevivência neuronal (LIMA *et al.*, 2007). Esta comunicação cruzada foi elegantemente demonstrada por Lima e colaboradores (2007). Neste trabalho foi observado um aumento na taxa de neuritogênese em co-culturas de neurônios e astrócitos que expressam PrP^C, quando comparados com co-culturas de astrócitos provenientes de animais nocaute para a proteína príon celular.

PrP^C também modula a consolidação da memória, via interação com laminina. Infusão intrahipocampal de anticorpos anti-PrP^C ou anti-laminina prejudica a retenção da memória avaliada no teste de esQUIVA inibitória. (COITINHO *et al.*, 2006). Usando este mesmo modelo experimental foi demonstrado que anticorpos anti STI-1 injetados diretamente no hipocampo

também prejudicam a memória, quando comparados com infusão de IgG irrelevante. É interessante notar que injeção do peptídeo de STI-1 correspondente ao sítio de ligação a PrP^C melhora a formação e consolidação da memória (COITINHO *et al.*, 2007).

Os efeitos neuroprotetores e neurotróficos de PrP^C aqui descritos estão esquematizados na figura 3.

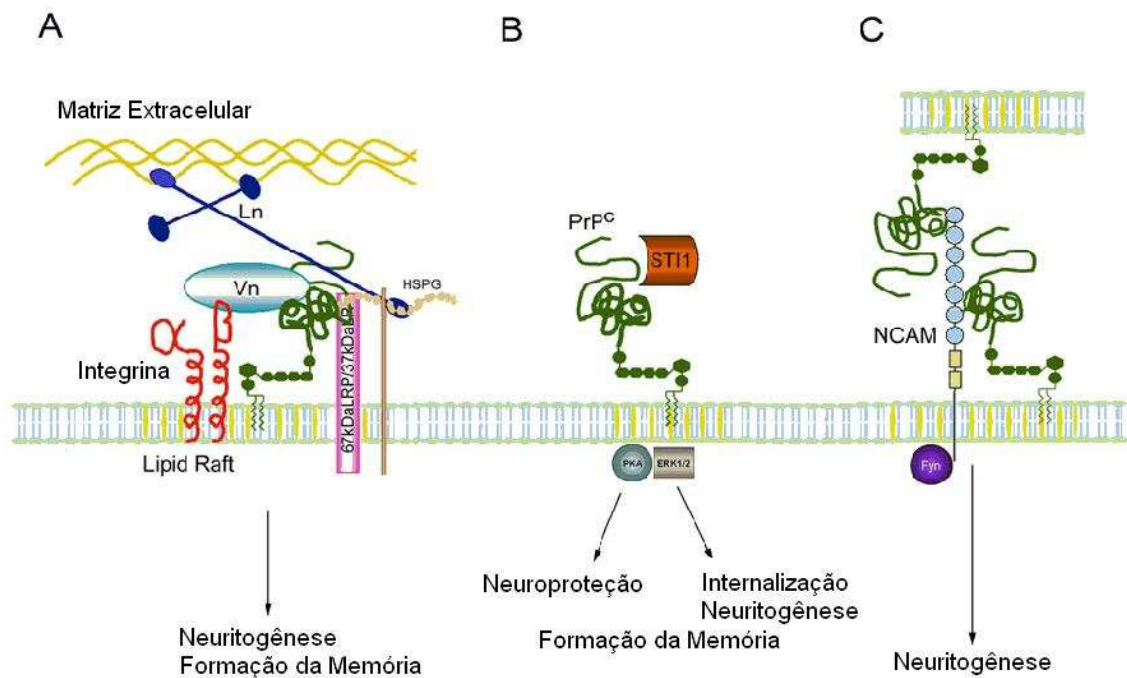


Figura 3 – Atividade neurotrófica de PrP^C e seus ligantes A) PrP^C interage diretamente com as proteínas de MEC Laminina (Ln) e Vitronectina (Vn) e ainda com o receptor de laminina (37LRP/67LR). Proteoglicanos Heparan Sulfato (HSPG) e Integrinas parecem também fazer parte deste complexo, envolvido em neuritogênese e formação de memória. B) PrP^C interage com STI-1 secretada e promove neuroproteção e neuritogênese por vias de sinalização independentes (PKA e ERK 1/2). C) A ligação de NCAM com PrP^C em *cis* ou em *trans* promove neuritogênese. (adaptado de MARTINS *et al.*, 2010)

2.1.4.2 PrP^C e Câncer

A biologia do câncer conheceu um enorme progresso na última década. Um dos maiores avanços é talvez o reconhecimento de que o bloqueio da morte celular, em particular da apoptose, é um aspecto importante da tumorigênese e resistência a drogas anti-tumorais (revisado em MEHRPOUR & CODOGNO, 2009).

Vários trabalhos têm mostrado o envolvimento de PrP^C na resistência tumoral à apoptose (MEHRPOUR *et al.*, 2004; DU *et al.*, 2005; MESLIN *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado por Mehrpour e colaboradores (2004), a expressão de PrP^C foi analisada na linhagem de carcinoma de mama MCF-7 sensível ao Fator de Necrose Tumoral (TNF) e no clone resistente a TNF (MCF-7/TNF). Foi observado um aumento na expressão de PrP^C tanto no nível de mRNA (17 vezes) quanto de proteína (10 vezes) nas células resistentes a TNF, quando comparadas à linhagem sensível. Além disso, a expressão ectópica de PrP^C conferiu resistência à apoptose à linhagem sensível a TNF através de um mecanismo que envolve alteração da liberação do citocromo C da mitocôndria e condensação nuclear (MEHRPOUR *et al.*, 2004). Este mesmo grupo mostrou que silenciamento de PrP^C em carcinoma resistente a adriamicina sensibiliza as células à morte celular pelo ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL). Neste trabalho foi utilizada a linhagem MCF-7 sensível a TRAIL, um clone resistente a TRAIL e um clone com resistência a múltiplas drogas (MCF-7/Adr). A transfecção destas células com RNA de interferência para PrP^C levou a ativação da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, levando assim à abolição da resistência à apoptose induzida por TRAIL que os 2 clones originalmente possuíam (MESLIN *et al.*, 2007a).

Recentemente, utilizando análises de estrutura-função, foi mostrado que a hélice 3 do domínio C-terminal de PrP^C é necessária e suficiente para promover atividade anti-Bax em células MCF-7 e em culturas primárias de neurônios humanos (LAROCHE-PIERRE *et al.*, 2009). Foi mostrado também que deleções de até três dos octapeptídeos ou deleção das duas primeiras α -hélices e folhas β também é capaz de abolir a atividade anti-Bax. (LAROCHE-PIERRE *et al.*, 2009).

Uma análise imunohistoquímica e de microarranjo de tecido de 756 tumores primários de mama mostrou que a expressão de PrP^C se correlaciona com tumores negativos para receptor de estrógeno. Quando estes dados foram comparados com os resultados da quimioterapia com adjuvante percebeu-se que os pacientes que se beneficiaram do uso da antraciclina apresentavam o

fenótipo negativo para receptor de estrógeno e para PrP^C, o que sugere o envolvimento deste último na resistência ao tratamento (MESLIN *et al.*, 2007b).

Durante o processo de angiogênese induzido por células tumorais é comum a formação de vasos aberrantes, com pouco fluxo sanguíneo, que levam a regiões de hipóxia no interior do tumor. Em células normais, hipóxia é um estímulo tóxico, porém as células tumorais sofreram alterações genéticas e epigenéticas que as permite sobreviver e proliferar nestas condições. Desta forma, a hipóxia acaba promovendo um fenótipo tumoral mais agressivo ao selecionar as células mais aptas a sobreviver neste ambiente nocivo (POUYSSÉGUR *et al.*, 2006). Foi observado que a hipóxia induz superexpressão de PrP^C, tanto no nível de mRNA quanto proteína em várias linhagens de câncer de estômago. O silenciamento de PrP^C tornou estas células mais sensíveis a drogas anti-tumorais após indução de hipóxia (LIANG *et al.*, 2007).

Superexpressão de PrP^C também foi detectada na linhagem de carcinoma gástrico resistente a adriamicina SGC7901 (DU *et al.*, 2005). Nesta linhagem foi também relatado que inibição de PrP^C por RNAi ou oligonucleotídeos *antisense* é capaz de reverter o fenótipo de resistência múltipla a drogas anti-tumorais através da alteração da expressão das proteínas Bcl-2, Bax e da proteína P-gp (DU *et al.*, 2005).

Outro estudo analisou o papel de PrP^C na progressão tumoral em células mesenquimais embrionárias de camundongo transformadas pelos oncogenes *ras* e *myc*. Foi observado um aumento na taxa de agregação celular e embolia em células nocauteadas para *Prnp*, quando comparado com o fenótipo selvagem. A ausência de PrP^C, acompanhada por um aumento na ativação de integrinas, resultou portanto em tumores de fenótipo mais agressivo, com um maior número de metástases e maior área de colonização (MURAS *et al.*, 2009).

2.2 METALOPROTEASES DE MATRIZ

A primeira descrição de uma metaloprotease de matriz (MMP) data de 1962, quando Gross e Lapière observaram que a pele da cauda de um girino em metamorfose liberava uma enzima capaz de digerir a tripla hélice do colágeno, sobre o qual era cultivada (GROSS & LAPIÈRE, 1962).

Desde então, esta área tem conhecido um rápido crescimento, com aproximadamente 10 000 citações na literatura, e cerca de 1000 sendo adicionadas a cada ano (BRINCKERHOFF & MATRISIAN, 2002).

2.2.1 Classificação das MMPs

As MMPs são uma família de enzimas endoproteolíticas dependentes de zinco que, por sua vez, pertencem à superfamília metzincina. A assinatura desta superfamília, que também inclui as serralisinas, astacinas e ADAMs, é a sequência de ligação ao zinco HEBXHXBGBXHZ, onde B é um aminoácido hidrofóbico, X é um resíduo variável e Z é um aa específico para cada família. (STÖCKER *et al.*, 1995).

Em humanos existem 23 MMPs, que de acordo com a especificidade de substrato, similaridade de sequência e organização de domínios, podem ser classificadas em 6 subgrupos: colagenases, gelatinases, matrilisinas, estromelinas, metaloproteases de membrana e “outras mmps” (MURPHY & NAGASE, 2008).

O grupo das colagenases é constituído pelas MMP-1, -8 e -13 e a principal característica destas enzimas é a capacidade de clivar colágeno intersticial tipo I, II e III a $\frac{3}{4}$ da região N-terminal (BRINCKERHOFF & MATRISIAN, 2002).

Estudos com enzimas quiméricas mostraram que ambas as extremidades da MMP-1 são necessárias para a sua atividade colagenolítica. Inicialmente dá-se a ligação e orientação da fibra de colágeno, depois a abertura da tripla hélice e por fim a clivagem seqüencial de cada cadeia α individualmente, uma vez que o sítio ativo é estreito demais para acomodar a tripla hélice inteira (OVERALL, 2001).

As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são codificadas por genes localizados no cromossomo humano 16 e caracterizam-se pela capacidade de digerir colágeno tipo IV desnaturado ou gelatina (MURPHY & CRABE, 1995).

O grupo das estromelisininas é composto pelas MMP-3 e -10, ambas sendo codificadas por genes que se encontram no cromossomo 11. Têm especificidade de substrato semelhante, apesar da MMP-3 apresentar maior eficiência proteolítica do que a MMP-10 (VISSE & NAGASE, 2003). Clivam vários componentes da MEC, como proteoglicanos, fibronectina e laminina, e participam da ativação de outras MMPs (MATRISIAN, 1992; VISSE & NAGASE, 2003).

A MMP-11 também é uma estromelisinina, no entanto é frequentemente classificada como “outras MMPs” devido às divergências em relação à MMP-3 no que diz respeito à sequência e especificidade de substrato. Por exemplo, a MMP-11 é codificada no cromossomo 22, cliva serpinas mais prontamente do que moléculas de matriz e é ativada intracelularmente (WOESSNER & NAGASE, 2000).

As matrilisininas (MMP-7 e MMP-26) são caracterizadas pela ausência do domínio hemopexina. A MMP-7 é a menor MMP, com apenas 19kDa na sua forma ativa, no entanto é capaz de processar inúmeras moléculas além dos componentes da MEC, como pró-TNF- α e E-caderina. A MMP-26, ao contrário da maioria das MMPs, parece ser estocada intracelularmente em grandes quantidades (MURPHY & NAGASE, 2008).

Existem seis MMPs de membrana, ou MT-MMPs: quatro proteínas transmembrana tipo I (MMP-14, 15, 16 e 24) e duas proteínas ancoradas por GPI (MMP-17 e 25). Todas possuem uma sequência de reconhecimento de furina RX[R/K]R e portanto são ativadas intracelularmente (NAGASE *et al.*, 2006). São frequentemente associadas à ativação de pró-MMPs, mas também são capazes de digerir moléculas da matriz extracelular. As MT-MMPs ainda desempenham um papel importante na restrição de eventos proteolíticos a regiões específicas da superfície celular (STERNLICHT & WERB, 2001).

Por não se classificarem nas categorias anteriores, existem sete enzimas (MMP-12, 19, 20, 21, 23, 27 e 28) que são agrupadas como “outras MMPs” (NAGASE *et al.*, 2006). A MMP-23 destaca-se pelo fato de não possuir o domínio hemopexina nem o “*cysteine switch*” no pró-domínio. Em vez disso,

esta enzima apresenta um domínio rico em cisteína seguido de um domínio semelhante a imunoglobulina. Devido à sequência de reconhecimento de furina, é clivada no complexo de Golgi e secretada como uma enzima ativa no espaço extracelular (WOESSNER & NAGASE, 2000).

2.2.2 Estrutura das MMPs

Os genes que codificam as metaloproteases apresentam uma estrutura modular altamente conservada. As collagenases e estromelinas têm 10 éxons e 9 íntrons em 8-12 kb de DNA. As matrilisinas não têm os éxons 7-10, que codificam para o domínio hemopexina, nem a maior parte do éxon 6, que codifica a região de ligação. Os genes das gelatinases têm 3 éxons adicionais, que codificam 3 repetições de fibronectina tipo II, sendo portanto consideravelmente maiores, conferindo-lhes uma diferença de 26-27 kb (revisado em DAS *et al.*, 2003).

Tipicamente, uma MMP é constituída por um peptídeo sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, uma região de ligação conhecida como região “*hinge*” e um domínio hemopexina (figura 4) (revisado em MATRISIAN, 1992).

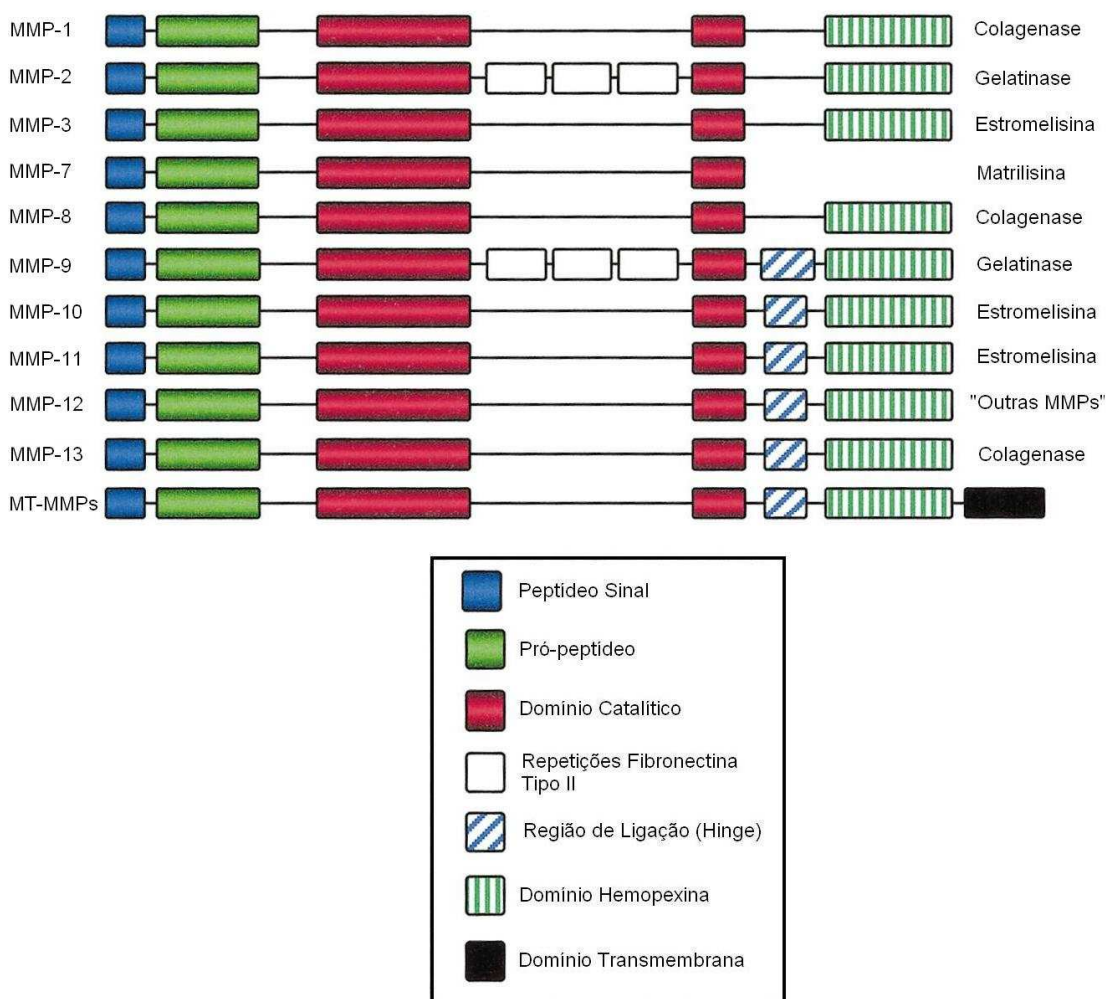


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura geral e classificação das principais MMPs. A estrutura geral de cada subfamília de MMP está aqui esquematizada. Vale lembrar que a MMP-9 tem ainda uma inserção de colágeno não evidenciada na figura. Quanto às MT-MMPs, foram representadas apenas as que apresentam um domínio transmembrana (MMP-14, 15, 16 e 24), substituído por uma âncora de GPI nas MMP-17 e 25 (adaptado de MASSOVA *et al.*, 1998).

O peptídeo sinal é uma sequência hidrofóbica de 18 a 30 resíduos responsável pelo endereçamento da proteína para o retículo endoplasmático. É clivado durante o trânsito no interior da célula, não sendo observado na enzima madura presente no meio extracelular (revisado em WOESSNER & NAGASE, 2000).

O pró-domínio tem aproximadamente 80 aminoácidos e estende-se desde a extremidade N-terminal gerada após a remoção do peptídeo sinal até ao início do domínio catalítico. O pró-domínio não é importante para a conformação da enzima, no entanto é essencial para regulação da atividade da mesma. O grupo –SH do resíduo de cisteína 73 na sequência conservada

PRCGVPD está posicionado diretamente sobre o átomo de zinco no sítio ativo, sendo responsável pela manutenção da enzima no estado latente. Este é chamado *cysteine switch*, pois quando este resíduo é deslocado do sítio ativo acontece a ativação da enzima (WOESSNER & NAGASE, 2000).

O domínio catalítico tem aproximadamente 160 a 170 aminoácidos e conta com a sequência conservada **HEXGHXXGXXH** na sua porção C-terminal. É aqui que se encontra o zinco catalítico, ligado aos três resíduos de histidina, e ainda um átomo de zinco estrutural e três átomos de cálcio. O quarto ligante do zinco catalítico é a cisteína do pró-domínio no zimogênio ou uma molécula de água na enzima ativa. O domínio catalítico tem também uma metionina conservada, oito resíduos após a sequência ligante de zinco, responsável por manter a estrutura tridimensional do sítio ativo, conhecida como "*Met-turn*" (MASKOS & BODE, 2003).

A ligação do substrato à enzima desloca a molécula de água do átomo de zinco. O ácido glutâmico adjacente à primeira histidina é essencial para catálise: o grupo carboxil do glutamato atua como uma base, retirando um próton da molécula de água deslocada, facilitando o ataque nucleofílico da água polarizada ao carbono carbonil da ligação peptídica. Em geral, as MMPs clivam uma ligação peptídica antes de um resíduo com cadeia lateral hidrofóbica, como leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina ou tirosina (VISSE & NAGASE, 2003). Estes resíduos encaixam dentro um espaço conhecido como *S1' pocket* à direita do zinco do sítio ativo, de natureza hidrofóbica, com tamanho e forma variáveis entre as MMPs. Este espaço acomoda a cadeia lateral do resíduo do substrato que se torna a nova extremidade N-terminal após a clivagem, sendo um dos principais fatores determinantes da especificidade de substrato de cada MMP (MURPHY & NAGASE, 2008).

As gelatinases contam ainda com três repetições *em tandem* de mais ou menos 58 resíduos cada de fibronectina tipo II, responsáveis pela ligação à gelatina, colágeno e laminina. A MMP-9, além de ser altamente glicosilada, apresenta também uma inserção de colágeno tipo V de 54 resíduos, rica em prolina, o que faz dela o maior membro desta família (92 kDa). A função deste inserto ainda é incerta (WOESSNER & NAGASE, 2000).

A região de ligação (*hinge*) é rica em prolina, pode variar entre 2 a 72 aminoácidos, está situada entre o final do domínio catalítico e a primeira

cisteína do domínio semelhante a hemopexina e também pode influenciar a especificidade de substrato (WOESSNER & NAGASE, 2000).

O domínio hemopexina é constituído por quatro lâminas unidas por uma ponte dissulfeto entre a lâmina I e a IV. Cada lâmina contém uma α -hélice e quatro folhas β -pregueadas antiparalelas. Este domínio é semelhante à proteína de matriz vitronectina e é responsável pela interação de MMPs com outras proteínas (VISSE & NAGASE, 2003; NAGASE *et al.*, 2006). Por exemplo, o domínio hemopexina é responsável pela ligação entre MMP-2 e TIMP-2, MMP-2 e glicosaminoglicanas, pela interação entre MMP-9 e TIMP-1, MMP-9 e MMP-1, MMP-9 e proteoglicanos e pela formação de homodímeros de MMP-9, através da lâmina IV (MALLA *et al.*, 2008a; MALLA *et al.*, 2008b). Além disso, foi recentemente proposto que este domínio seria importante para migração de células COS-1 transfectadas com pró-MMP-9 (DUFOR *et al.*, 2008).

Por último, o domínio transmembrana é uma sequência altamente hidrofóbica de 74 resíduos que se estende além do domínio hemopexina, na região C-terminal, presente apenas nas MT- MMPs de membrana tipo I (WOESSNER & NAGASE, 2000).

2.2.3 A MEC e os Substratos das MMPs

Os tecidos conjuntivos são caracterizados pela abundância de matriz extracelular, que é sintetizada, secretada e organizada pelas células aí residentes, os fibroblastos. Esta rede de macromoléculas é constituída por proteínas fibrosas (colágenos, elastina), glicoproteínas (fibronectina, nidogênio e laminina), glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, heparan sulfato, condroitim sulfato e queratam sulfado) e proteoglicanos (agrecam, sindecam, decorin, perlecam, entre outros) (McCawley e Matrisian, 2001). Imediatamente adjacente aos tecidos conjuntivos está a lâmina basal, uma estrutura que sustenta todos os tecidos epiteliais e que parece ser uma característica comum a todos os animais multicelulares. A lâmina basal é formada por colágeno tipo IV, laminina, nidogênio e perlecam e algumas de suas funções incluem guiar a migração celular, coordenar a regeneração de tecidos após uma lesão, controlar a polaridade e diferenciação celular, entre outras (Yurchenko *et al.*, 2004).

Coletivamente, a família das MMPs é responsável pela degradação de todos os componentes da MEC, incluindo os constituintes da lâmina basal. Apesar de outras proteases também serem capazes de clivar a matriz extracelular, acredita-se que as MMPs sejam os principais mediadores fisiológicos deste processo (MATRISIAN, 1992). Além disso, está claro que as MMPs também são capazes de clivar e liberar fragmentos bioativos, citocinas e fatores de crescimento aprisionados na MEC, como o fator de necrose tumoral TNF- α , a interleucina IL 1- β e o fator de crescimento transformante TGF- β (McCawley & Matrisian, 2001, Mott & Werb, 2004).

Na tabela 2 estão resumidos os substratos das principais MMPs.

TABELA 2 - SUBSTRATOS DAS PRINCIPAIS MMPS

MMP	Grupo	Massa Molecular Latente/Ativa (kDa)	Substratos Clássicos	Outros Substratos
1	Colagenase	55/45	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina, Entactina, Agrecan, Tenascina	Pro-MMP 1,2 Pro-TNF α
2	Gelatinase	72/66	Gelatina, Elastina, Fibronectina, Colágeno I/IV/V/VII/X/XI, Laminina, Agrecan, Vitronectina	Pro MMP 1,2,13 Pro-TNF α Pro-TGF β 2 Pro-IL 1- β
3	Estromelisina	57/45	Proteoglicanos, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI, Fibrina/Fibrinogênio, Entactina, Tenascina, Vitronectina	Plasminogênio Pro-MMP 1,3,7,8,9,13 Pro-TNF α , Pro-IL 1- β Perlecan
7	Matrilisina	28/19	Proteoglicanos, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI, Fibrina/Fibrinogenio, Entactina, Tenascina, Vitronectina	Pro-MMP 2,7, Pro-TNF α Plasminogênio
8	Colagenase	75/58	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina, Entactina, Agrecan, Tenascina	Pro-MMP 8
9	Gelatinase	92/86	Gelatina, Elastina, Fibronectina, Colágeno I/IV/V/VII/X/XI, Laminina, Agrecan, Vitronectina	Pro-TNF α Plasminogênio Pro-IL 1- β Pro-TGF β 2
10	Estromelisina	57/44	Proteoglicanos, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Colágeno III/IV/V/IX/X/XI, Fibrina/Fibrinogenio, Entactina, Tenascina, Vitronectina	Pro-MMP 1,8,10
13	Colagenase	60/48	Colágeno I/II/III/VII/X, Gelatina, Entactina, Agrecan, Tenascina	Pro-MMP 9,13
14	Membrana	66/56	Gelatina, Fibronectina, Vitronectina, Colágeno, Agrecan	Pro-MMP 2,13
16	Membrana	64/52	Gelatina, Fibronectina, Vitronectina, Colágeno, Agrecan	Pro-MMP 2
26	Matrilisina	28/19	Gelatina, Colágeno IV, Fibronectina, Fibrinogênio	Pro-MMP 9

(adaptado de McCawley e Matrisian, 2001)

2.2.4 Regulação de MMPs

Para evitar a destruição de tecidos, a regulação da atividade de MMPs deve ser mantida sob um rigoroso controle, a nível transcricional, pós transcricional e pós-traducional, desde a secreção e ativação da proenzima até

inibição da enzima ativa, sua internalização e degradação (STERNLICHT & WERB, 2001).

2.2.4.1 Regulação Transcricional e Pós -Transcricional de MMPs

A expressão de MMPs pode ser induzida por fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, hormônios, produtos de oncogenes, interações célula-célula e célula-matriz. Geralmente, estes estímulos induzem a expressão de membros da família *c-fos* e *c-jun*, cujos produtos geram formas homo e heterodiméricas do fator de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1), que por sua vez se liga a sequências específicas de DNA na região promotora do gene (STERNLICHT & WERB, 2001).

Todas as MMPs contêm a sequência AP-1 na região promotora, exceto a MMP-2, cuja expressão é constitutiva, sendo regulada apenas por estabilização do mRNA (OVERALL *et al.*, 1991) e por um mecanismo de ativação único, que envolve TIMP-2 e MT1-MMP. (STRONGIN *et al.*, 1995).

Uma vez que a preferência de substrato das MMPs tende a sobrepôr-se, a função biológica de cada MMP é determinada em grande parte pelo seu padrão de expressão espaço-temporal e fatores de transcrição aos quais é susceptível em um dado contexto celular (STERNLICHT & WERB, 2001). Por exemplo, ésteres de forbol induzem a expressão de MMP-3 mas não de MMP-10 em fibroblastos, enquanto o oposto é observado em queratinócitos (WINDSOR *et al.*, 1993) Além disso, o mesmo sinal - TGF- β - suprime a transcrição dos genes de MMP-1 e MMP-3, mas induz a expressão de MMP-13 em fibroblastos (URIA *et al.*, 1998).

Mecanismos de regulação pós-transcricionais também podem influenciar a expressão de MMPs. Por exemplo, a forma solúvel e proteoliticamente ativa da MMP-16, uma metaloprotease transmembrana, é gerada por *splicing* alternativo, em vez de *shedding* da superfície celular (STERNLICHT & WERB, 2001).

Em queratinócitos imortalizados foi proposto que a integrina $\alpha 3\beta 1$ é capaz de regular a estabilidade do mRNA de MMP-9, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi esclarecido (IYER *et al.*, 2005).

2.2.4.2 Regulação Pós-Traducional de MMPs

Após a tradução, a maioria das MMPs é secretada constitutivamente, no entanto, em alguns casos, a secreção pode ser regulada. Por exemplo, granulócitos em diferenciação na medula óssea sintetizam e posteriormente, já como neutrófilos circulantes, armazenam MMP-8 e -9 em grânulos. Quando se dá a ativação destes neutrófilos por mediadores inflamatórios, as MMPs estocadas são secretadas (STERNLICHT & WERB, 2001).

Uma vez no espaço extracelular, as MMPs precisam ser ativadas, visto que todas as metaloproteases (exceto as MT-MMPs e a MMP-11) são secretadas na forma de zimogênio (MURPHY & NAGASE, 2008).

MMPs podem ser ativadas por agentes químicos ou por outras proteases (figura 5).

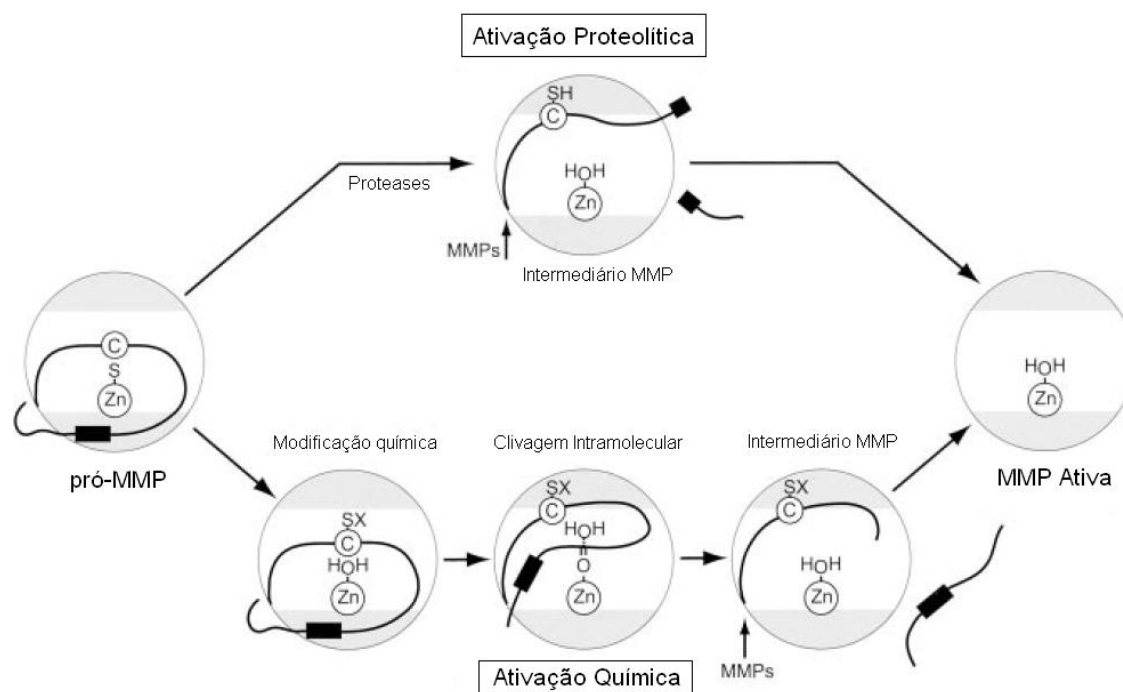


Figura 5 - Representação esquemática da ativação proteolítica e química das MMPs. A ativação proteolítica de pró-MMPs dá-se por clivagem seqüencial do pró-domínio, formando inicialmente um intermediário parcialmente ativado. A ativação química dá-se através da desestabilização da interação entre a cisteína do pró-domínio e o zinco catalítico, levando a uma auto-clivagem intra-molecular e depois clivagem por outras proteases do restante do pró-domínio, originando a enzima ativa (adaptado de Visse e Nagase, 2003).

Durante isquemia cerebral, foi demonstrado que o óxido nítrico pode ativar pró-MMP-9 ao reagir com o grupo tiol do "cysteine switch", formando um

derivado S-nitrosilado, como exemplo de ativação química *in vivo* (GU *et al.*, 2002a).

In vitro, MMPs podem ser ativadas por agentes caotrópicos, glutathione oxidada, SDS, espécies reativas de oxigênio, compostos com mercúrio como HgCl₂ ou aminofenilmercúrio (APMA), iodocetamida, n-etilmaleimida e ainda exposição rápida a pH ácido ou tratamento de calor (WOESSNER & NAGASE, 2000). Estes agentes provavelmente atuam através da desestabilização da interação entre o grupo sulfidrila do *cysteine switch* e o átomo de zinco catalítico, levando a um autoprocessamento proteolítico do pró-domínio. Contudo, o mecanismo exato de ativação de pró-MMPs por agentes químicos ainda não foi completamente elucidado (WOESSNER & NAGASE, 2000).

A ativação proteolítica de MMPs acontece passo-a-passo, inicialmente através da geração de uma forma intermediária e na sequência, de uma forma madura (sendo esta última reação frequentemente catalizada por outra MMP ativa). Esta característica reflete a necessidade de um controle preciso do processo de ativação de MMPs, uma vez que os intermediários parcialmente ativados também estão sujeitos a inibição, antes mesmo da sua maturação completa (WOESSNER & NAGASE, 2000).

A ativação de uma pró-MMP inicia-se com um ataque proteolítico à região exposta entre a primeira e segunda alça do pró-peptídeo. Assim que uma parte do pró-domínio é removida, o restante torna-se instável e desloca a cisteína do sítio ativo, permitindo o processamento intermolecular por outras metaloproteases (WOESSNER & NAGASE, 2000).

No entanto, pró-MMP-2 é geralmente refratária a ativação por outras proteases e por este motivo a sua ativação acontece principalmente na superfície celular, mediada por MT-MMPs e TIMP-2 (STRONGIN *et al.*, 1995; DERYUGINA *et al.*, 2001).

Primeiro, o domínio N-terminal de TIMP-2 liga-se e inibe a metaloprotease de membrana MT1-MMP ou MMP-14. Então, o domínio C-terminal de TIMP-2 atua como um receptor para o domínio hemopexina da pró-MMP-2. Na sequência, uma segunda molécula de MT1-MMP cliva e ativa a pró-MMP-2 immobilizada. Por último, uma porção residual do pró-domínio que permanece após a clivagem por MT1-MMP é removida por outra MMP-2,

originando assim a forma madura completamente ativada da enzima (STRONGIN *et al*, 1995; DERYUGINA *et al.*, 2001).

A ativação da MMP-2 está esquematizada na figura 6.

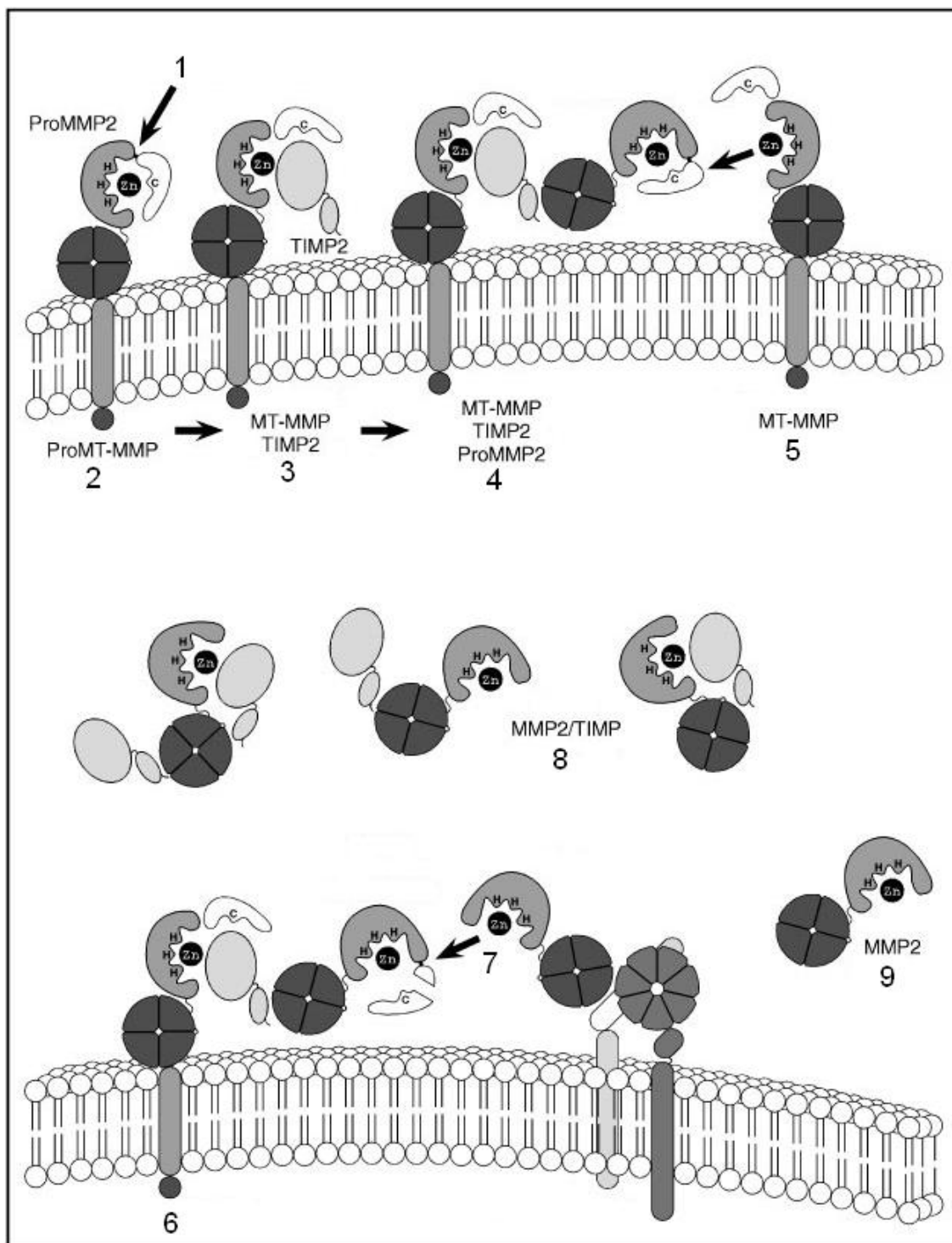


Figura 6 - Representação esquemática da ativação de MMP-2 na membrana celular por TIMP-2 e MT-MMP. Inicialmente pró-MMP-2 (1) liga-se a MT1-MMP (2), originando o complexo MMP-2/MT1-MMP. O pró-domínio é deslocado e TIMP-2 liga-se ao complexo anterior (3). Uma segunda pró-MMP-2 liga-se ao TIMP-2 imobilizado no complexo (4) e é ativada por uma terceira MMP-2 ligada a um segundo MT1-MMP (5), através da clivagem de uma porção do pró-domínio (6). Essa reação pode ser

catalisada por uma MMP ligada a outra molécula que atue como receptor (7). Por fim, são liberados complexos MMP2/TIMP-2 (8) e a enzima ativa (9) (adaptado de Sternlicht e Werb (2001)).

Uma característica importante deste aparato de ativação é a sua localização na superfície da célula, o que restringe a proteólise a uma região discreta do microambiente pericelular, concentrando e confinando as MMPs nas proximidades dos seus alvos (YONG *et al.*, 1998; SATO & TAKINO, 2010).

Outras formas de limitar a difusão de MMPs incluem a ligação a receptores de superfície (como CD44, CD147 e as integrinas $\alpha\beta 3$ e $\alpha 2\beta 1$), a ligação a proteínas de matriz (como colágeno IV e heparan sulfato) e a expressão de MT-MMPs. Isto porque MT-MMPs podem aglomerar-se em regiões específicas da membrana, como as protusões celulares conhecidas como pseudópodos invasivos ou invadopódios, onde acontece intensa degradação da MEC (STERNLICHT & WERB, 2001).

Uma vez finalizada a sua atividade, as MMPs estão sujeitas a inibição por duas classes principais de moléculas: a α_2 -macroglobulina, os inibidores teciduais de metaloproteases ou TIMPs (BRINCKERHOFF & MATRISIAN, 2002), e a proteína RECK (reversion inducing cystein-rich protein with Kazal motifs) (CLARK *et al.*, 2007).

A α_2 -macroglobulina é uma abundante proteína plasmática de 725 kDa, constituída por 4 subunidades idênticas de 180 kDa, que seqüestra e inibe endopeptidases em geral. Na seqüência, o complexo α_2 -macroglobulina/protease é rapidamente capturado pela proteína relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade -1 (LRP-1) e internalizado. Apesar de ser frequentemente desprezada, devido à ênfase dada aos TIMPs, a α_2 -macroglobulina é o principal inibidor de fase fluída de MMPs, desempenhando um importante papel na sua eliminação irreversível (STERNLICHT & WERB, 2001).

Os TIMPs são uma família de proteínas secretadas que inibem reversivelmente MMPs. A sua ação é predominantemente local, restrita a regiões específicas de um tecido ou membrana basal. O domínio N-terminal dos TIMPs interage com o átomo de zinco do domínio catalítico de uma MMP, e quando este é quelado, a atividade enzimática é inibida (WOESSNER &

NAGASE, 2000). As características desta família de proteínas serão discutidas posteriormente em maior detalhe.

A glicoproteína ancorada por GPI RECK também atua como um inibidor não competitivo da atividade enzimática das gelatinases MMP-2 e MMP-9 e da MMP de membrana MT1-MMP, através de interações físicas que envolvem, por exemplo, os seus domínios semelhantes a inibidores de serina proteases (OH *et al.*, 2001).

In vitro, as MMPs podem ser inibidas por agentes quelantes de íons divalentes (como EDTA, EGTA e 1, 10 – fenantrolina) e por uma série de inibidores sintéticos que estão sendo desenvolvidos para fins comerciais, tendo em vista a sua aplicação farmacêutica (COUSSENS *et al.*, 2002).

Por fim, após a inibição das MMPs, deve ser efetuado o seu clareamento³. Uma das proteínas envolvida nesse processo é a α_2 -macroglobulina (STERNLICHT & WERB, 2001). Outra é a trombospondina-2, uma proteína capaz de se ligar tanto à forma latente quanto ativa da MMP-2, que normalmente é endocitada via LRP-1, carregando consigo a enzima durante o processo (YANG *et al.*, 2001).

2.2.5 Evolução das MMPs

Análise da estrutura dos íntrons e éxons dos genes que codificam MMPs sugere que vários membros desta família surgiram por duplicação gênica e rearranjo de éxons (MATRISIAN, 1992).

O pré, pró e domínio catalítico estão presentes em todas as MMPs e são essenciais para a sua função enzimática, pelo que aparentam ser componentes de um “gene primordial”. A duplicação deste gene primordial teria sido seguida da inserção de éxons que codificam o domínio hemopexina. Na sequência deu-se a inserção das repetições de fibronectina, originando a MMP-2, cujo gene teria sofrido duplicação e adição do inserto semelhante a colágeno tipo IV, originando a MMP-9, o maior membro desta família. Esta hipótese é sustentada pela observação de que os genes das collagenases e estromelinas, que têm os quatro domínios básicos se encontram no cromossomo 11, enquanto que os

³ Clareamento ou Depuração (*clearance*) – termo utilizado na fisiologia designar a capacidade de retirada, pelos rins, de alguma substância da corrente sanguínea. Neste contexto pode ser entendido como capacidade de internalização e degradação de componentes do meio extracelular, pelas células (Alberts *et al.*, 2008).

genes das gelatinases, com inserções adicionais, estão no cromossomo 16 (MATRISIAN, 1992).

É tentador especular que a matrilisina, a menor MMP, seria o representante atual do “gene primordial”. A aquisição posterior de outros domínios seria responsável pela especificidade de substrato de cada membro desta família, assumindo que as enzimas evoluíram na mesma ordem que os seus substratos (MATRISIAN, 1992). A matrilisina tem a atividade proteoglicanase mais forte de todas as enzimas testadas e carboidratos complexos são uma característica da superfície de células procarióticas e eucarióticas. Por outro lado, os precursores mais antigos dos colágenos fibrilares e não fibrilares identificados até agora foram isolados da esponja, um metazoário basal. Estas observações sugerem que glicoproteínas e proteoglicanos surgiram antes do que as proteínas fibrosas de matriz. Por este motivo, as primeiras MMPs reconheceriam estes substratos, enquanto que a atividade colagenolítica evoluiria com o aparecimento de colágenos (MATRISIAN, 1992).

Uma visão alternativa da evolução das MMPs propõe que a matrilisina tenha surgido por deleção do domínio hemopexina, sendo portanto mais derivada. A MMP mais basal seria a estromelisina 3, a mais próxima das metaloproteases de bactérias (MATRISIAN, 1992).

Outra teoria tentou conciliar as duas anteriores: o domínio hemopexina teria sido introduzido em uma matrixina ancestral entre um bilhão e 850 milhões de anos atrás e em seguida teria sido perdido da MMP-7 como um evento secundário, entre 650 e 250 milhões de anos atrás (MASSOVA *et al.*, 1998).

Análise da sequência das regiões que codificam o domínio catalítico produziu resultados interessantes: aparentemente este domínio evoluiu em paralelo em cada MMP, o que indica que a pressão seletiva sobre o domínio catalítico foi diferente no curso da diversificação desta família de enzimas (MASSOVA *et al.*, 1998).

2.3 INIBIDORES TECIDUAIS DE MMPS

2.3.1 Estrutura e aspectos gerais

Até ao momento foram caracterizados quatro inibidores teciduais de metaloproteases em vertebrados, designados como TIMP-1, -2, -3 e -4. Estão presentes na maioria dos tecidos, sendo expressos em vários tipos celulares (revisado em BREW & NAGASE, 2010).

Apesar de todos os TIMPs inibirem MMPs, as suas propriedades diferem ligeiramente. Por exemplo, enquanto que a expressão de TIMP-2 é constitutiva, os restantes membros desta família têm expressão induzível e frequentemente tecido - específica (revisado em CHIRCO *et al.*, 2006).

As moléculas capazes de induzir a expressão de TIMPs incluem fatores de crescimento, citocinas, eritropoietina, interleucinas, entre outras (revisado em LAMBERT *et al.*, 2004).

Outra diferença é a forma de apresentação: os TIMPs -1, -2 e -4 estão presentes na forma solúvel, enquanto que TIMP-3 está fortemente ligado à MEC (BREW & NAGASE, 2010).

As características de cada TIMP estão resumidas na tabela 3.

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE TIMPS

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Cromossomo	X	11	22	3
Massa Molecular (kDa)	20,6/28,5	21,5	21,6//27	22,3
Sítios N-glicosilação	2	0	1	0
Apresentação	Solúvel	Solúvel/Sup. Celular	Ligado à MEC	Solúvel/Sup. Celular
Expressão	Induzível	Constitutiva	Induzível	Induzível
Complexo pró-MMP	pró-MMP-9	pró-MMP-2	pró-MMP-2/-9	pró-MMP-2
Tecido Enriquecido	Ovário, Osso	Rim, Placenta	Rim, Timo, Ovário, Coração, Baço	Coração, SNC, Músculo Esq., Ovário

(adaptado de Woessner e Nagase, 2000; Lambert *et al.*, 2004; CHIRCO *et al.*, 2006);

Os TIMPs (21 a 29 kDa) são constituídos por um domínio N-terminal (~125 aa) e um domínio C-terminal (65 aa), cada um com 3 pontes dissulfeto conservadas. O domínio N-terminal dobra-se como uma unidade separada, capaz de inibir MMPs, na proporção de 1:1, através da interação de resíduos

de cisteína com o zinco catalítico (BREW & NAGASE, 2010). Esta região contém a sequência VIRAK, conservada em todos os TIMPs (aa 18-22) (LAMBERT *et al.*, 2004).

O domínio C-terminal, apesar de não participar diretamente do processo de inibição, aumenta a sua eficiência por ajustar a conformação da proteína, de tal forma a ajustar o encaixe do inibidor no sítio ativo das MMPs, de forma similar à ligação enzima/substrato. Além disso, o domínio C-terminal é importante para interação com outras proteínas, incluindo pró-MMPs, o que possibilita a regulação do processo de ativação de metaloproteases (BREW & NAGASE, 2010).

2.3.2 TIMPs como proteínas multifuncionais

TIMPs promovem crescimento celular em uma variedade de tecidos, tanto normais quanto tumorais, por mecanismos independentes de inibição de MMPs. Além disso, TIMPs podem modular apoptose via inibição de MMPs, na maioria dos casos (LAMBERT *et al.*, 2004).

Outra atividade biológica importante atribuída a TIMPs é a diferenciação eritróide, com um corpo de evidências cada vez maior que destaca a participação ativa da matriz extracelular na indução da proliferação e diferenciação de células tronco hematopoiéticas (LAMBERT *et al.*, 2004).

Um corpo crescente de evidências tem apontado TIMPs como proteínas capazes de promover eventos de sinalização celular. Já foram descritos alguns parceiros moleculares de TIMPs na superfície celular, como a integrina $\alpha 3\beta 1$ para TIMP-2, o receptor-2 de VEGF para TIMP-3 e CD63 para TIMP-1 (SEO *et al.*, 2003; CHIRCO *et al.*, 2006; STETLER-STEVENSON, 2008).

A interação de TIMP-2 com $\alpha 3\beta 1$ regula negativamente a transdução de sinal via receptor de tirosina quinase, levando a uma parada do ciclo celular e inibição da angiogênese (SEO *et al.*, 2003).

Outro trabalho mostrou que a interação de TIMP-1 com CD-63, um membro da família tetraspanina, ativa sinais de sobrevivência mediados por integrina $\alpha 3\beta 1$ (CHIRCO *et al.*, 2006).

Resumindo, podemos concluir que TIMPs são proteínas complexas envolvidas em inúmeros eventos fisio-patológicos, com atividades pleotrópicas

críticas para a comunicação entre a matriz extracelular e as redes de sinalização intracelular (CHIRCO *et al.*, 2006).

2.4 GELATINASES, TIMPS E O SNC

Atualmente, as MMP-2 e -9, também conhecidas como gelatinases, ocupam um lugar de destaque na literatura, provavelmente devido à facilidade de detecção, através de métodos relativamente simples e econômicos, como zimografia (KUPAI *et al.*, 2010). Tem sido dada particular atenção à sua importância em processos fisiológicos e patológicos no SNC (DZWONEK *et al.*, 2004).

Em 1998, Uhm e colaboradores cultivaram oligodendrócitos (isolados de pacientes com epilepsia refratária a medicação) sobre uma matriz extracelular derivada de astrócitos humanos de origem fetal. Nessa matriz foram detectadas várias proteínas da MEC, como fibronectina, vitronectina e laminina. Eles perceberam que quando as células eram tratadas com ésteres de forbol (PBD), agonistas da proteína quinase C (PKC), se observava intensa formação de prolongamentos celulares e concomitante aumento da atividade de MMP-9. Ambos os efeitos foram revertidos por inibição farmacológica da PKC. Os resultados foram confirmados *in vivo* no corpo caloso de camundongos, um tecido rico em oligodendrócitos. Mais tarde, o mesmo grupo mostrou que o crescimento de prolongamentos em oligodendrócitos provenientes de animais nocaute para MMP-9 é significativamente reduzido. Estes dados sugerem que esta gelatinase é necessária para a formação de processos celulares (OH *et al.*, 1999).

Ainda em 1998, Lampert e colaboradores publicaram um estudo no qual a progressão maligna de gliomas foi correlacionada com aumento na expressão de MT1-MMP e MMP-2. Mostraram também que medulomas expressam níveis altos de MMPs, quando comparados com tecido normal.

Vários trabalhos apontaram o envolvimento de MMPs em outras patologias do sistema nervoso. Na doença de Alzheimer, as MMPs podem mediar a deposição de proteínas β -amilóides. Na esclerose múltipla, as MMPs podem ser responsáveis pelo influxo de células inflamatórias no SNC, podem

contribuir para a destruição da mielina e romper a integridade da barreira hemato-encefálica (YONG *et al.*, 1998).

Em outro estudo foi analisado o padrão de expressão espaço-temporal de MMPs e TIMPs durante o desenvolvimento pós-natal do cerebelo de ratos: a expressão máxima de MMP-9 foi observada em P10, diminuindo em P15 e no animal adulto, enquanto que a atividade de MMP-2 permaneceu constante durante toda a janela temporal analisada. A expressão célula-específica e regional de MMPs e TIMPs refletem os estágios sucessivos do desenvolvimento, sugerindo um papel importante da proteólise da MEC na plasticidade e ontogenia do SNC (VAILLANT *et al.*, 1999).

Na mesma linha de pesquisa, o grupo polonês liderado por Leszlek Kaczmarek observou a participação de MMPs no remodelamento dependente de atividade da arquitetura dendrítica. Após administração sistêmica de kainato, um agonista do receptor de glutamato que provoca aumento da transmissão sináptica e convulsões, foi detectado um aumento da expressão e ativação de MMP-9, mas não MMP-2, no giro denteado do hipocampo de ratos adultos (SZKLARCYK *et al.*, 2002). Independentemente, outro trabalho obteve os mesmos resultados, porém com uma interpretação diferente. Segundo o grupo francês chefiado por Santiago Rivera, o aumento da atividade de MMP-9 observado no hipocampo de ratos adultos seria responsável pela excitotoxicidade induzida por kainato, uma vez que administração de um inibidor específico de MMP-9 (S24994) protege neurônios hipocámpais deste insulto (JOURQUIN *et al.*, 2003). Na sequência surgiu outro trabalho para reforçar estes dados. Usando um modelo de isquemia cerebral focal transiente em camundongos, Zezong Gu e colaboradores concluíram que SB-3CT, um inibidor de MMP-9 altamente específico, evita a degradação de laminina e consequentemente protege neurônios de entrar em apoptose (GU *et al.*, 2005).

Por outro lado, um grupo americano mostrou que a atividade de MMPs é necessária para a aquisição de memória espacial em ratos. Devido ao dano causado por injeção intraperitoneal de etanol foi registrado um aumento na latência em encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático de Morris, indicando um comprometimento da função hipocámpal e da memória espacial. Quando o hipocampo desses animais foi analisado, percebeu-se uma diminuição na atividade de MMP-9, mas não MMP-2. O mesmo foi constatado

no córtex pré-frontal, embora com menor intensidade. No cerebelo, não foram percebidas alterações significativas. Sabendo que a protéolise parece ser um pré-requisito para a reconfiguração da MEC necessária ao processo de plasticidade sináptica que precede a consolidação da memória, concluí-se que o prejuízo causado por etanol deve ser causado pelo bloqueio da atividade de MMPs (WRIGHT *et al.*, 2003).

Em 2005, o mesmo autor mostrou que administração do inibidor de MMP-3 e MMP-9 FN-439 no hipocampo de ratos compromete a aquisição de memória espacial no labirinto aquático, sugerindo que este dano seria causado pelo bloqueio na capacidade de remodelar a arquitetura das moléculas da MEC (WRIGHT *et al.*, 2005).

No ano seguinte, o grupo de Washington mostrou ainda que aumento na expressão de MMP-3 e MMP-9 provocado pela aprendizagem durante o labirinto de Morris é em grande parte dependente da ativação do receptor de glutamato NMDA e que inibidores específicos ou oligonucleotídeos *antisense* para estas metaloproteases suprimem a aquisição de memória espacial (MEIGHAN *et al.*, 2006). Mostraram também que inibição de MMP no hipocampo impede tanto a indução quanto a estabilização da potencialização de longo termo (LTP), processo tido como a base neurobiológica do aprendizado e memória (MEIGHAN *et al.*, 2007).

Através de duas abordagens diferentes, em uma utilizando um teste comportamental que avalia memória de longo prazo (NAGY *et al.*, 2007) e em outra analisando plasticidade sináptica e LTP (BODAZGI *et al.*, 2007), o grupo de pesquisa supervisionado por George Huntley chegou à mesma conclusão: em ambos é necessária atividade de MMP-9.

Novamente contrapondo esta hipótese, o grupo de Rivera e Jourquin publicou um estudo no qual observaram que camundongos nocauteados para TIMP -1 têm um prejuízo de aprendizado e memória, acessados através de um teste que avalia a capacidade de fazer associações entre odor e recompensa. Camundongos que super-expressam TIMP-1 obtiveram melhor desempenho neste modelo do que animais selvagens (CHAILLAN *et al.*, 2006).

Apesar de parecerem contraditórios, no fundo todos estes trabalhos reforçam a idéia de que o balanço entre taxa de MMP/TIMP deve ser precisamente regulado, visto que um desequilíbrio na atividade proteolítica

(tanto aumento quanto diminuição) pode prejudicar os eventos relacionados com plasticidade neuronal e por consequência, funções cognitivas como o aprendizado e a memória.

2.5 GELATINASES, TIMPS E CÂNCER

A idéia de que MMPs são meros instrumentos utilizados pelas células tumorais para ultrapassar as barreiras físicas que contêm o seu crescimento e assim invadir e colonizar outros tecidos tem sido desafiada por um grupo crescente de evidências que sugere o envolvimento destas proteases em todas as etapas da progressão tumoral, desde o início do desenvolvimento da neoplasia até o estabelecimento de um tumor secundário em um local ectópico (revisado em KESSENBROCK *et al.*, 2010; RADISKY & RADISKY, 2010, COUSSENS *et al.*, 2002).

Análise de amostras de tecidos tumorais humanos revelou que as MMPs aí presentes são em grande parte produzidas por células reativas do estroma recrutadas para o ambiente neoplásico. Estes dados sugerem que a presença de MMPs pode ser uma resposta do hospedeiro induzida pelo tumor. Além disso, a expressão aumentada de MMPs foi detectada no tecido neoplásico antes da destruição da membrana basal e surgimento de tumores malignos. Estas observações sustentam a hipótese de que as MMPs desempenham funções que vão além da abertura de espaços por onde o tumor possa escapar (COUSSENS *et al.*, 2002).

Superexpressão de MMPs invariavelmente induz lesões hiperproliferativas espontâneas em modelos animais de câncer. Quando desafiados com carcinógenos químicos ou ativação de oncogenes, estes animais exibem um aumento da frequência de surgimento de tumores. O contrário também é verdade: camundongos com maior propensão ao surgimento de tumores em um cenário livre de MMPs desenvolvem menos tumores *de novo* (COUSSENS *et al.*, 2002).

Apesar da capacidade de degradar a matriz extracelular ser importante, essa atividade por si só não responde pela miríade de eventos biológicos mediados por estas enzimas. Aliás, é provavelmente a atividade das MMPs sobre outros substratos (como citocinas, fatores de crescimento e seus

receptores, moléculas de adesão e mediadores de apoptose) que sustenta as rápidas respostas celulares necessárias para o crescimento e progressão tumoral (COUSSENS *et al.*, 2002).

A mudança de paradigmas aqui descrita está esquematizada na figura 7.

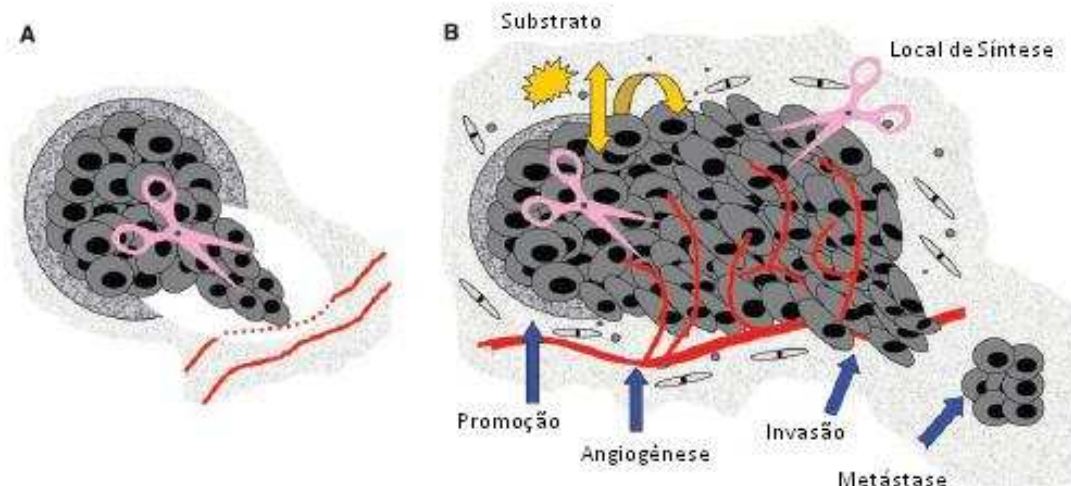


Figura 7 – Função da MMPs na Progressão Tumoral A) Visão clássica das MMPs (representadas por tesouras) no câncer: as metaloproteases eram produzidas e secretadas por células tumorais e degradavam os componentes da membrana basal, permitindo assim invasão tumoral e metástase. B) Visão atual: as MMPs são produzidas e secretadas não só por células tumorais, mas também por células do estroma (como fibroblastos e células inflamatórias infiltrantes); Além de degradar os componentes da MEC, as MMPs também atuam sobre outras moléculas, solubilizando fatores anteriores ligados à matriz ou à superfície celular. Estes fatores então influenciam vários aspectos do comportamento como crescimento, migração e apoptose, de maneira autócrina ou parácrina; Por último, as MMPs participam dos vários estágios da progressão tumoral, desde o seu surgimento e neovascularização até à invasão dos tecidos adjacentes e metástase para locais ectópicos (adaptado de Coussens *et al.*, 2006).

No que diz respeito ao envolvimento de TIMPs no câncer, também estamos em fase de transição de paradigmas. O velho dogma de que regulação negativa de MMPs por TIMPs seria importante no bloqueio da progressão de tumores malignos está sendo confrontado com evidências experimentais que indicam que TIMPs também podem desempenhar funções favoráveis ao crescimento tumoral (STERNLICHT & WERB, 2001; JIANG *et al.*, 2002).

De fato, crescimento, invasão tumoral e metástase podem ser inibidos por TIMPs. Por exemplo, superexpressão de TIMP-1 inibiu o crescimento

tumoral e a capacidade de metástase em células de câncer de estômago, em melanomas e em carcinoma esquamoso oral. Transferência adenoviral de TIMP-3 em células HELA, no fibrosarcoma HT1080 e em células de melanoma inibiu a capacidade invasiva destas células e induziu apoptose. Superexpressão de TIMP-4 em células MDA-MB-435 inibiu o crescimento tumoral, invasão e metástase (JIANG *et al.*, 2002).

Vários mecanismos podem contribuir para este efeito anti-tumoral de TIMPs. Por exemplo, TIMPs têm atividade antiangiogênica tanto pela a inibição de MMPs, quanto por um efeito direto na proliferação de células endoteliais. Foi demonstrado que MMP-9 é capaz de disparar o estímulo angiogênico ao liberar VEGF da matriz extracelular (BERGERS *et al.*, 2000). Além disso, na linhagem de câncer de pulmão A549 silenciamento de MMP-2 por RNAi inibe a expressão de VEGF por uma via de sinalização mediada pela integrina $\alpha\beta3$ (CHETTY *et al.*, 2010).

Paradoxalmente, MMPs também podem regular negativamente a angiogênese ao converter plasminogênio em angiostatina ou ao clivar a porção C-terminal do colágeno XVIII, liberando endostatina. Ambos, angiostatina e endostatina têm potente efeito anti-angiogênico, mas a sua produção pode ser bloqueada por TIMPs, o que significa que os inibidores teciduais de MMPs também podem auxiliar a progressão tumoral (JIANG *et al.*, 2002 STERNLICHT & WERB, 2001).

Concluindo, TIMPs são proteínas multifuncionais que regulam a proliferação celular, apoptose, angiogênese e ativação de pró-MMPs. Os efeitos aparentemente contraditórios de TIMPs no câncer refletem apenas a complexidade dos eventos biológicos regulados por estas proteínas, cuja função está muito além da inibição de MMPs (BREW & NAGASE, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar uma possível relação funcional entre a proteína príon celular e a metaloprotease 9.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o papel de PrP^C na modulação da expressão e atividade de MMP-9 em células MEF;
- Avaliar o efeito de moléculas de matriz extracelular na atividade de MMP-9 secretada por células MEF;
- Investigar a participação de PrP^C no processo de ativação de pró-MMP-9 em fibroblastos imortalizados.
- Determinar a função de PrP^C na adesão célula-matriz de fibroblastos imortalizados;
- Analisar o efeito da superexpressão de PrP^C na atividade de MMP-9 em células HEK 293T;
- Determinar o efeito do silenciamento do gene que codifica PrP^C por RNA de interferência na expressão gênica de MMP-9 em células MDA-MB-435;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA CELULAR

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens murinas de origem embrionária de fibroblastos imortalizados (MEF): uma selvagem (^{+/+}) e outra nocaute para PrP^C (^{0/0}) (gentilmente cedidas pela Dr.^a Vilma Martins, São Paulo). Os métodos de isolamento e imortalização destas linhagens foram descritos anteriormente (MURAS *et al.*, 2009).

As células MEF foram cultivadas em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) (Cultilab).

Posteriormente foi utilizada uma linhagem de células embrionárias de rim de origem humana (HEK-293T). As células HEK 293T foram mantidas em meio MEM (meio de mínimo essencial de Eagle).

Por último, foi utilizada a linhagem MDA-MB-435, originalmente descrita como tumor de mama pela *American Type Culture Collection*. Esta linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 (Cultilab).

Todas as linhagens foram cultivadas em meio acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 1mM de glutamina (Vetec) e 40 mg/L de gamicina (Shering-Plough) e todas foram incubadas em estufa úmida a 37°C e com 5% CO₂.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MEF QUANTO À EXPRESSÃO DE PrP^C POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Células MEF (10⁴ por poço) tipo selvagem e nocaute para a proteína príon celular foram semeadas sobre lamínulas circulares de vidro e cultivadas em meio apropriado durante 24h. Na sequência foram fixadas com vapor de formaldeído durante 15 minutos e com paraformaldeído 4% durante 20 minutos. As células foram lavadas três vezes com PBS e bloqueadas com PBS acrescido de 2% de albumina bovina sérica (BSA) e 2% de soro normal de cabra (NGS) durante 3 horas a temperatura ambiente. Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário anti- PrP^C M46 de líquido ascítico (diluído 1:50 na solução de bloqueio) ou com IgG anti-PrP^C purificada (10

$\mu\text{g/mL}$) por 16 horas, em câmara úmida, a 4°C . Como controle negativo foi utilizado líquido ascítico não imune (1:50). Para retirada dos anticorpos não ligados, as células foram lavadas três vezes com PBS e então incubadas com o anticorpo secundário anti – mouse ALEXA 488 (na diluição 1:800, na solução de bloqueio) durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Após a ligação do secundário, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS. As lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando meio apropriado de conservação. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot.

4.3 OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS

Células MEF $^{+/+}$ e $^{0/0}$ com aproximadamente 90% de confluência foram lavadas com PBS/EDTA e tripsinizadas. Em seguida foram ressuspensas em meio de cultivo, contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas na densidade de 1×10^6 células em placas P60 (TPP, Suíça). Duas horas depois o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS e foi adicionado meio DMEM sem SFB por 24h. O meio condicionado foi coletado e centrifugado por 2 minutos a 800 xg para eliminar as células mortas. O sobrenadante foi concentrado $\sim 17x$ no ultraconcentrador Amicon ultra, com filtro de exclusão de 10 kDa (Milipore, USA) através de centrifugação a 5000 xg por 25 minutos a 4°C . O material recuperado foi utilizado para avaliação da expressão ou atividade gelatinolítica de MMPs.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MMPs POR *WESTERN BLOTTING*

O sobrenadante de meio de cultura de células MEF ou extrato celular da linhagem HEK 293T transfectada foi analisado por *Western Blotting (WB)*. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel com 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, que foi corada com Ponceau-S para análise da eficiência da transferência. O bloqueio foi realizado com 5% leite sem gordura (Molico, Nestlé) em solução de TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl e 0,05%

Tween 20) e na sequência a membrana foi incubada por 16 horas a 4° C com os anticorpos primários anti - MMP 9 (Chemicon, diluição 1:1000), anti-MMP-2 (Santa Cruz, diluição 1:500), ou anti-PrP^C (soro hiperimune de camundongo M32, 1:1000) diluídos em TBST- leite. A membrana foi então lavada com TBST e incubada por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase (anti-*rabbit* HRP para MMP-9, na diluição 1:2000, anti-*goat* HRP para MMP-2, na diluição 1:1000 ou anti-*mouse* HRP para PrP^C, na diluição 1:3000). A membrana foi lavada novamente com TBST e a reação evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (West Pico, Pierce CO.) sobre a membrana, exposta a um autoradiograma (Amersham, G.E.).

4.5 EFEITO DE PROTEÍNAS DE MATRIZ SOBRE A SECREÇÃO DE MMPS

Para determinar o efeito de proteínas de matriz sobre a capacidade de secretar MMPs de células MEF, 5×10^5 células foram plaqueadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e foram deixadas aderir por 2h. Em seguida o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS e condicionadas por 16h em DMEM sem SFB, acrescido de 5 µg/mL de vitronectina (VN), laminina (LN), fibronectina (FN) ou matrigel (MT), diluídas em PBS. Como controle foi utilizado apenas PBS. Na sequência o meio foi coletado e processado de acordo com o protocolo descrito em 4.3. A atividade gelatinolítica foi avaliada através do ensaio baseado em microplaca e por zimografia.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS POR ENSAIO BASEADO EM MICROPLACAS UTILIZANDO GELATINA BIOTINILADA

Foi utilizado o protocolo estabelecido por Ratnikov e colaboradores (2000), com algumas modificações. Uma placa com estreptavidina imobilizada (Nunc) foi pré-lavada com 300µl/poço de PBS acrescido de 0,05 % Tween 20 (PBST 0,05%). Em seguida foi incubada por 2h a 37°C com 100 µl/poço de 0,5 µg de gelatina biotinizada previamente digerida por 3h a 37° C pelas enzimas

do sobrenadante de meio de cultivo de cada linhagem, processado como descrito no item 4.3. Amostras incubadas com gelatina biotinizada na presença de 10 mM do inibidor de MMPs de amplo espectro 1,10-Phenanthroline foram utilizadas como controle negativo (GB não digerida). Os fragmentos que não se ligaram à placa foram eliminados através da etapa de lavagem com PBST e então estreptavidina acoplada à enzima peroxidase foi incubada por 1 hora a 37°C. Foi realizada mais uma etapa de lavagem e então foram adicionados 100 µl/poço da solução de revelação: tampão citrato (50mM fosfato dissódico monoácido, 24mM ácido cítrico, pH 5 a 5,2), OPD (o-fenildiamina) (0,2 mg/mL em tampão citrato pH 5 - 5,2) e 0,06% peróxido de hidrogênio. Após 5 a 15 minutos de incubação no escuro, a temperatura ambiente, a revelação foi interrompida com 10µL/poço de solução de H₂SO₄ 2M, possibilitando a leitura da absorbância (Abs) em leitor de microplacas com filtro de 490nm. O cálculo da % de digestão foi realizado com a seguinte fórmula $[1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{GB não digerida}}) * 100]$.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE MMPS POR ZIMOGRAFIA

O sobrenadante do meio de cultura de células MEF, processado como descrito no item 4.3 ou amostras de HEK 293T transfectada foram analisados por zimografia, como descrito anteriormente, com algumas modificações (UHM *et al.*, 1998). Brevemente, as amostras foram submetidas a uma SDS – PAGE em gel de poliacrilamida 10% 1,5 mm co-polimerizado com 3 mg/ml de gelatina (Bio Rad) em tampão de amostra 5x concentrado não redutor. A separação eletroforética foi efetuada a 4°C por 16h em 5 mA. O gel foi então lavado com 2,5% de Triton X-100 por três vezes de 15 minutos para remoção do SDS e renaturação da enzima e foi incubado por 24h a 37°C em Tampão Ótimo (5 mM Tris, 200 mM NaCl, 4,5 mM CaCl₂), para digestão do substrato imobilizado. O gel foi corado com 0,01% Coomassie Blue, 10% Ácido Acético Glacial e 30% metanol. A atividade gelatinolítica foi avaliada como bandas brancas em fundo azul.

4.8 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

O ensaio de adesão celular foi realizado como descrito por Luque *et al.* (1994), com pequenas modificações. Placas de 96 poços (Nunc) foram tratadas com 15 µg/mL de fibronectina, vitronectina, laminina ou matrigel diluídos em PBS. Após incubação por 16 horas a 4° C, os poços foram lavados com PBS para retirar proteínas não adsorvidas e então foram bloqueados com PBS-BSA 2% por 2 horas a 37° C. Células MEF foram plaqueadas na densidade de 10⁵ células por poço e foram deixadas aderir por 2 horas a 37° C. Em seguida, os poços foram lavados com PBS para remoção das células não aderidas. As células que permanecerem nos poços foram fixadas com metanol por 20 minutos e coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol) por 30 minutos a temperatura ambiente. O corante foi extraído com solvente apropriado (0,5% ácido acético, 50% metanol) e a absorbância mensurada em 650nm.

4.9 SUPEREXPRESSÃO DE PRÓ-MMP-9 EM CÉLULAS HEK 293T

Células HEK 293T foram transfectadas pelo método de co-precipitação de fosfato de cálcio (PÜSCHEL *et al.*, 1995) com o plasmídeo pcDNA 3.1 codificando a sequência completa da pró-MMP-9 humana com etiqueta *c-myc* e 6-histidinas (gentilmente cedido pela Dr.^a Athina K. Tzinia, Atenas, Grécia), com plasmídeo pcDNA 3.1 codificando a proteína príon celular murina com o epítipo 3F4 humano (VINCENT *et al.*, 2000) ou com plasmídeo pcDNA 3.1 vazio (controle). Brevemente, 12 µg do plasmídeo de interesse foram solubilizados em 750 µl de água deionizada autoclavada, em seguida foram adicionados 250 µl de solução 1 M CaCl₂ e 1 mL de solução 2X BBS (50 mM BES, 250 mM NaCl e 1 mM Na₂HPO₄, pH 6,95). Depois de cinco minutos de incubação a temperatura ambiente, 8 ml de meio MEM acrescido de 10% SFB foram adicionados.

Uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (TPP) contendo células HEK 293T entre 70 e 80% de confluência teve seu meio de cultura aspirado e então a solução de transfecção descrita acima foi adicionada. A placa foi incubada durante 5 horas em estufa úmida com 5% CO₂. Em seguida, o meio

foi retirado, a placa foi cuidadosamente lavada com PBS e as células condicionadas em meio MEM sem SFB pelo tempo indicado. O meio condicionado enriquecido com pró-MMP-9 foi coletado, processado como descrito no item 4.3 e utilizado em experimentos subsequentes. As células foram lisadas em tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCL pH 7,4, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% Triton X-100, 1% NP-40, e coquetel de inibidores de proteases (Complete-Roche)) por 40 minutos e então foram centrifugadas a 23000 xg durante 15 minutos a 4° C. O extrato celular foi dosado pelo método de Bradford (1976) e 100 µg de proteína foram adicionadas a tampão de amostra redutor 2,5x concentrado. As amostras foram fervidas por 10 min e analisadas por WB como descrito no item 4.4. Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 4.

TABELA 4 – LISTA DE PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Vetor	Sequência	Origem	Observações
pcDNA 3.1	Pró-MMP-9 (completa)	humana	Etiqueta de histidinas
pcDNA 3.1	PrP ^C (completa)	murina	Epítipo 3F4 humano
pcDNA 3.1	(nenhuma)	-----	-----

4.10 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE PrP^C NA ATIVAÇÃO DE PRÓ-MMP-9

1x10⁶ células MEF de cada linhagem foram suspensas em 500 µL de meio DMEM sem SFB e incubadas com 100 µL de sobrenadante de HEK 293T enriquecido com pró-MMP-9 recombinante por 1h e 30 min a temperatura ambiente, sob agitação. As células foram sedimentadas por centrifugação (2 min 800xg) e o sobrenadante analisado por WB e zimografia quanto à presença da forma ativa de MMP-9.

Como controle, pró-MMP-9 recombinante foi ativada com aminofenilmercúrio (APMA, Sigma) como descrito anteriormente (Chemicon Internacional, 2004). A partir de uma solução estoque 10 mM de APMA em 0,1 M de NaOH foi preparada uma solução 2,5 mM de APMA em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,4. 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ e 0,005% NP-40. O pH foi ajustado para 7,0 - 7.5. Na sequência, 20 µL de sobrenadante condicionado

concentrado de HEK 293T transfectada com pró-MMP-9 humana foram adicionados a 100 µL da solução de APMA 2,5 mM e incubados por 3h a 37°C.

4.11 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MDA-MB-435 QUANTO À EXPRESSÃO DE PrP^C POR IMUNOPRECIPITAÇÃO

Células MDA-MB-435 foram coletadas e lisadas em tampão de lise por 1h no gelo e então centrifugadas a 23000 xg por 20 minutos a 4° C. Os extratos celulares foram previamente clarificados pela incubação com 40 µl de proteína A/G sepharose (GE) acrescido de 20 µl de soro normal de camundongo por 2 horas a 4° C, sob agitação. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada durante 5 min 23000 xg e o sobrenadante resultante dividido em duas partes: uma foi incubada com 10 µl soro normal de camundongo e a outra parte com 10 µl soro contendo anticorpos anti-PrP^C (M46) durante 16 horas a 4° C. Procedeu-se uma etapa de centrifugação por 2 min a 23000 xg para eliminar qualquer material agregado e então 40 µl proteína A/G sepharose foram incubados por mais duas horas para ligação do imunocomplexo à matriz sólida. Foram realizadas 5 lavagens com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com 40 µl tampão redutor 2,5x concentrado, fervido a 100°C durante dez minutos. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de acrilamida 10% e analisadas por WB utilizando os anticorpos anti-PrP^C.

4.12 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MDA-MB-435 QUANTO À EXPRESSÃO DE PrP^C POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células MDA-MB-435 cultivadas até 90% de confluência foram soltas mecanicamente com PBS e contadas em câmara de Neubauer. Foram utilizadas 10⁶ células por condição analisada. As células foram então lavadas uma vez com PBS-BSA 1% e bloqueadas nesta mesma solução por 40 min a temperatura ambiente, sob agitação. Na sequência foi incubado o anticorpo primário anti-PrP^C (0,1 µg/mL) por 1h a 4°C, ou o seu controle IgG normal (0,5 µg/mL). As células foram lavadas três vezes com a solução de bloqueio e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse Alexa 488 na diluição de 1:1000, por 1h a 4°C, no escuro. As células foram novamente lavadas três

vezes com PBS-BSA 1%, ressuspensas em PBS 1x filtrado e analisadas quanto à presença de PrP^C em citômetro de fluxo. Como controle negativo foram utilizadas células na qual o anticorpo primário foi omitido (somente secundário) e células sem nenhuma incubação com anticorpo para avaliar a porcentagem de auto-fluorescência (Branco).

4.13 SILENCIAMENTO DO GENE *PRNP* ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE INTERFERÊNCIA DE RNA (IRNA)

O RNA de interferência (iRNA) é do tipo Stealth[®] (Invitrogen) e foi desenhado com software Block-it RNAi Designer.

Células 435 (5×10^4 por poço, em placa de 24 poços) foram transfectadas com 20 pmol de RNA de interferência para o gene que codifica PrP^C utilizando o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle foi utilizado um duplex com a sequência de nucleotídeos embaralhada (*Scrambled*). A eficiência de transfecção foi avaliada com o duplex de RNA fluorescente TYE (Origene) por citometria de fluxo.

A sequência do duplex de RNA desenhado para interferência de PrP^C está evidenciada na tabela 5.

TABELA 5 – SEQUÊNCIA DO DUPLEX DE RNA PARA SILENCIAMENTO DO GENE *PRNP* QUE CODIFICA PrP^C

Alvo	Sequência
<i>PRNP</i>	5' GAGCAGAUGUGUAUCACCCAGUACG 3'
<i>Scrambled</i>	5' UGGCCGUCCAACGGUAAGGAGAUAU 3'

4.14 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-9 EM CÉLULAS MDA-MB-435 SILENCIADAS PARA O GENE *PRNP* QUE CODIFICA PrP^C

4.14.1 Extração de RNA total da linhagem MDA-MB-435

Após a transfecção com o RNAi, as células foram cultivadas por 24, 48 ou 72h e o RNA total foi extraído com kit Invitrap Tissue RNA (Invitex), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total obtido foi dosado espectrofotometricamente em Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

4.14.2 RT- PCR

O RNA extraído de MDA-MB-435 foi convertido em cDNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com a transcriptase reversa (RT) em duas etapas. Inicialmente, 500 ng de RNA total, 0,5 µg de Oligo dT (Invitrogen) e água com 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) (Amresco) (volume final 5µL) foram incubados a 72°C por 5 min e a 4°C por 5min em termociclador (Bio Rad). Na sequência foram adicionados 20 µL de uma solução contendo a enzima RT (Promega) em tampão para enzima RT 1X (Promega), 0,5 mM desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP), 3 mM MgCl₂ (Promega), 1 U de inibidor de RNase recombinante (Invitrogen) e água 0,01% DEPC. A segunda etapa da reação foi realizada a 25°C por 5 min, 60 min a 42°C e 15 min a 70°C.

4.14.3 PCR em tempo real

Todos os experimentos foram realizados no equipamento Rotor Gene 6000 (Corbett), utilizando SYBr Green PCR Master Mix (Invitrogen) e oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes que codificam as proteínas de interesse (MMP-9 e PrP^C) e para o gene normalizador que codifica a proteína hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT).

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 6.

TABELA 6 – SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS

Nome	Sequência	Tamanho do produto
	[]	
MMP-9 (200 nM)	F: 5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3' R: 5'-GATTTGACTCTCCACGCATCT-3'	104 pb
PrP ^C (300 nM)	F: 5'-AGGCAGAGCAGTCATTATGG-3' R: 5'-TGGCCACAAAGAGAACCAG-3'	59 pb
HPRT (400 nM)	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTG A-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'	101 pb

A eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores foi calculada de acordo com o método descrito por Schmittgen e Livak (2008) e verificou-se que todos os iniciadores possuem a mesma eficiência. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado 1 μ L de cada cDNA obtido através da reação de RT-PCR. A reação de amplificação deu-se por repetição de 40 ciclos de 10s a 95°C, 20s a 62°C e 15s a 72°C. Os resultados foram avaliados pelo método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ proposto por Livak e Schmittgen (2001).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via com teste *post hoc* de Tukey (GraphPad Prism software, San Diego, CA). Foram considerados significativos os resultados com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-9 EM CÉLULAS MEF SELVAGEM E NOCAUTE PARA A PROTEÍNA PRION CELULAR

Inicialmente as duas linhagens de células MEF gentilmente cedidas pela Dr^a Vilma Martins foram caracterizadas quanto à expressão de PrP^C por imunofluorescência (figura 8). Uma descrição completa do processo de imortalização destas linhagens a partir de animais nocaute para a proteína príon celular pode ser obtida em Muras e colaboradores (2009).

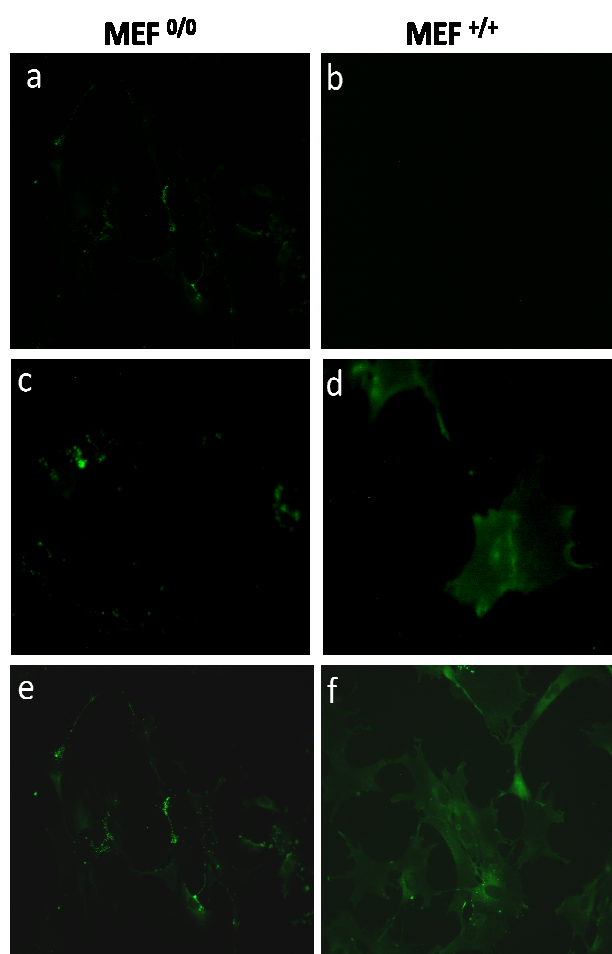


FIGURA 8 – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE MEF QUANTO À EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR POR IMUNOFLUORESCÊNCIA. Em a e b está representado o controle negativo no qual foi omitido o anticorpo primário. As células incubadas com líquido ascítico não imune apresentaram resultados semelhantes (dados não mostrados). As células selvagens (+/+) incubadas com IgG anti-PrP^C purificada (d) e com soro total de camundongo anti-PrP^C (f) apresentaram uma ampla marcação por toda a membrana plasmática, ao contrário das células nocaute (0/0) (c,e respectivamente), nas quais é observada uma marcação difusa comparável ao controle negativo (a), típica de reações inespecíficas ou precipitado de anticorpo secundário.

As MEF do tipo selvagem apresentaram uma marcação específica para PrP^C por toda a superfície celular, enquanto que nas células nocaute foi observada apenas uma marcação difusa, inespecífica. Uma vez confirmados os genótipos de cada linhagem foi possível prosseguir com os experimentos.

As duas linhagens foram então comparadas quanto à expressão de MMP-9. Para isso, amostras de sobrenadante condicionado e concentrado do meio de cultura foram analisadas por *Western Blotting* (figura 9). Para efeito de comparação, foi utilizada marcação para uma proteína secretada de expressão constitutiva, a MMP-2.

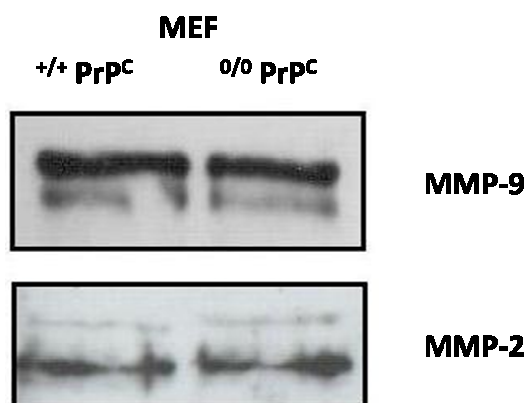


FIGURA 9 – PrP^C NÃO INFLUENCIA A EXPRESSÃO DE MMP-9 EM CÉLULAS MEF. A presença de MMP-9 secretada para o meio de cultura por células MEF selvagem (^{+/+}) e nocaute (^{-/-}) para a proteína príon celular foi analisada por Western Blotting. Não foi observada uma diferença entre as duas linhagens. Marcação para MMP-2 foi utilizada como parâmetro de comparação do carregamento de proteínas no gel.

Foi observado que ambas as linhagens possuem quantidades iguais de MMP-9, tanto na forma latente como ativa. Podemos concluir, portanto, que a expressão desta gelatinase ou é independente da presença de PrP^C ou a ausência da proteína príon celular é compensada nas células nocaute por outras moléculas, como descrito anteriormente (HAJJ *et al.*, 2007, MURAS *et al.*, 2009). O viés experimental da utilização de linhagens nocaute para estudo da função de uma proteína será analisado em maior detalhe na discussão.

Uma vez que várias moléculas podem induzir a expressão de MMP-9 (STERNLICHT & WERB, 2001) e que PrP^C participa de complexos multiprotéicos de transdução de sinal através de várias vias de sinalização

(LINDEN *et al.*, 2008), postulamos que talvez fosse necessário um estímulo externo para modulação da atividade de MMP-9 via PrP^C. Então, sabendo que moléculas de matriz podem modular a atividade das MMPs secretadas pelas células (WEEKS *et al.*, 1998; ESPARZA *et al.*, 1999; AL-HAZMI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2008) e que a molécula de matriz vitronectina se liga à proteína príon celular (HAJJ *et al.*, 2007), averiguamos se células MEF desafiadas com vitronectina (VN) seriam capazes de modular a atividade de MMP-9, dependendo da presença ou não de PrP^C na superfície celular. Paralelamente, outras células foram tratadas com fibronectina (FN), uma molécula de matriz que não se liga a PrP^C (HAJJ *et al.*, 2007) mas que também é capaz de modular MMPs (ESPARZA *et al.*, 1999; AL-HAZMI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2008).

As células foram então incubadas com as proteínas de MEC VN e FN e foram condicionadas em meio sem SFB por 16h. Como controle de ambos os tratamentos foi utilizado PBS. O sobrenadante do meio de cultura foi coletado, concentrado e analisado quanto à atividade das MMPs aí presentes através de ensaio baseado em microplaca para determinação de atividade gelatinolítica (figura 10A) e através de zimografia (figura 10B).

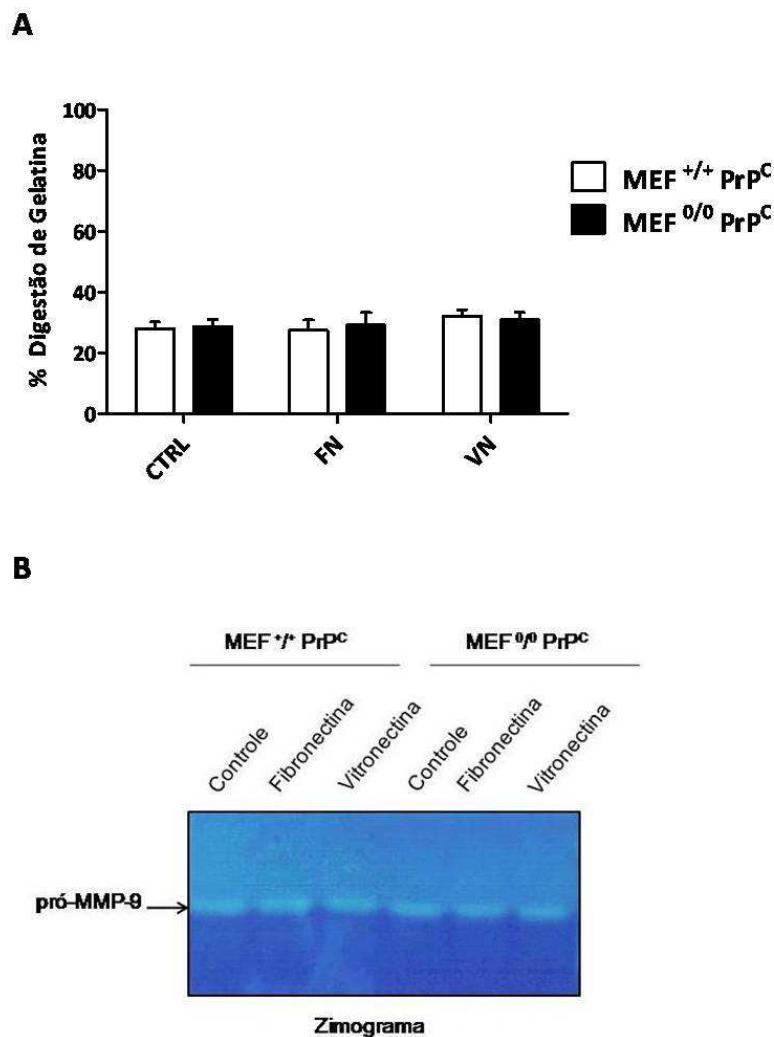


FIGURA 10 – A PRESENÇA DE FIBRONECTINA OU VITRONECTINA NÃO ALTERA A ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE CÉLULAS MEF. Células MEF selvagem (^{+/+}) e nocaute (^{-/-}) para a proteína príon celular foram desafiadas com FN ou VN em solução durante 16 horas. Como controle foi utilizado PBS. A atividade gelatinolítica de MMPs secretadas por cada linhagem foi avaliada por dois métodos: ensaio de digestão de gelatina biotinilada (A) e zimografia (B). Em A, as amostras, na sua condição nativa, são diretamente incubadas com substrato solúvel. A porcentagem (%) de digestão foi calculada em comparação com amostras não digeridas. Em B, as amostras são desnaturadas e separadas eletroforicamente e após renaturação são incubadas com tampão ótimo para digestão do substrato imobilizado. Não há diferença significativa entre as linhagens em nenhuma das condições experimentais analisadas ($p > 0,05$, ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey).

Através dos métodos aqui empregados, não foi detectada diferença significativa na atividade gelatinolítica basal de MMPs secretadas por células MEF ^{+/+} ou ^{0/0} para PrP^C. A adição das moléculas de matriz vitronectina e

fibronectina também não modulou a atividade de MMP-9 quando comparado com o controle, em nenhuma das linhagens.

PrP^C é uma molécula conhecida pela sua capacidade de interagir com inúmeras proteínas, como por exemplo ADAM-23 (COSTA *et al.*, 2009). Os membros desta família têm um domínio metaloprotease semelhante ao sítio catalítico de MMPs (COSTA *et al.*, 2009). Ainda não foi mapeado o sítio de interação entre estas duas moléculas e é possível que esta ocorra através do domínio metaloprotease, o que nos levou a levantar a possibilidade de PrP^C interagir diretamente com MMP-9. Esta interação poderia servir para imobilização de pró-MMP-9 na superfície celular, o que facilitaria a sua ativação por outras proteínas.

A MMP-2 é ativada por um mecanismo semelhante, sendo ancorada por MT1-MMP na membrana plasmática (STRONGIN *et al.*, 1995; DERYUGINA *et al.*, 2001). Já foi descrito que integrinas também podem desempenhar esse papel (HOFMANN *et al.*, 2000a; HOFMANN *et al.*, 2000b; DERYUGINA *et al.*, 2001; ROLLI *et al.*, 2003). Hofmann e colaboradores mostraram que não existe diferença significativa entre a expressão de MMP-2 e MT1-MMP em células de melanoma da linhagem BLM com ou sem a integrina $\alpha\beta 3$. No entanto, a presença de MMP-2 ativa só foi detectada no extrato de células que expressam $\alpha\beta 3$. Mostraram também que $\alpha\beta 3$ e MT1-MMP estão co-localizados na membrana dessas células e que, juntos, participam da ativação de MMP-2, que se liga diretamente a $\alpha\beta 3$ (HOFMANN *et al.*, 2000a). Propuseram ainda que a expressão coordenada das duas proteínas seria necessária para a invasão celular e formação de metástases (HOFMANN *et al.*, 2000b).

Face a estes achados, decidimos investigar uma possível participação de PrP^C no processo de ativação de pró-MMP-9.

Para isso foi necessário produzir pró-MMP-9 recombinante através de transfecção de células HEK 293T com plasmídeo codificando a sequência completa de MMP-9 humana (gentilmente doado pela Dr^a. Athina K. Tzinia, Atenas) . A enzima resultante foi validada por WB (figura 11A) e zimografia (figura 11B).

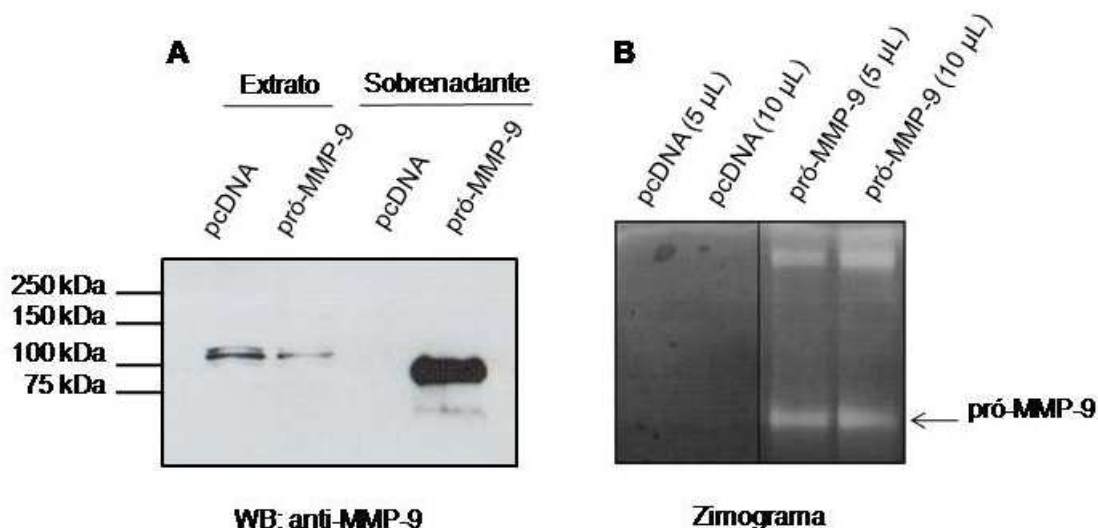


FIGURA 11 – PRÓ-MMP-9 HUMANA É CORRETAMENTE EXPRESSA EM CÉLULAS HEK 293T E TEM ATIVIDADE ENZIMÁTICA. Células HEK 293T foram transfectadas com plasmídeo codificando MMP-9 humana (pró-MMP-9) ou plasmídeo vazio (pcDNA). A expressão de pró-MMP-9 foi analisada no extrato e sobrenadante das células transfectadas por *Western Blotting* (A); Pode perceber-se que a maior parte da proteína exógena sintetizada é secretada para o meio de cultura, ao contrário do que acontece com a célula transfectada com vetor vazio, onde não é detectada enzima no meio extracelular. A análise da atividade enzimática por zimografia (B) mostra que a proteína é capaz de digerir colágeno tipo IV desnaturado.

Como descrito anteriormente, células HEK 293T expressam MMP-9 (LIU & WU, 2006). Porém, a quantidade de MMP-9 endógena secretada por HEK 293T é indetectável por *Western Blotting* ou zimografia do meio condicionado, sendo observada apenas no extrato celular de células transfectadas com o vetor pcDNA vazio.

Podemos observar que em células HEK 293T transfectadas com MMP-9 a proteína foi expressa e secretada para o meio extracelular, na forma pró-ativa. Além disso, a sua atividade pode ser detectada por zimografia, o que sugere que deve estar na sua conformação correta.

Para avaliar se PrP^C poderia participar do processo de ativação de MMP-9, células MEF em suspensão foram incubadas com a pró-enzima por 1h e 30 min a temperatura ambiente, sob agitação. Após uma centrifugação para separar as células do meio contendo pró-MMP-9, este último foi analisado por zimografia e *Western Blot*. Como controle, os resultados obtidos foram comparados com pró-MMP-9 e MMP-9 ativada quimicamente com APMA *in vitro* (figura 12)

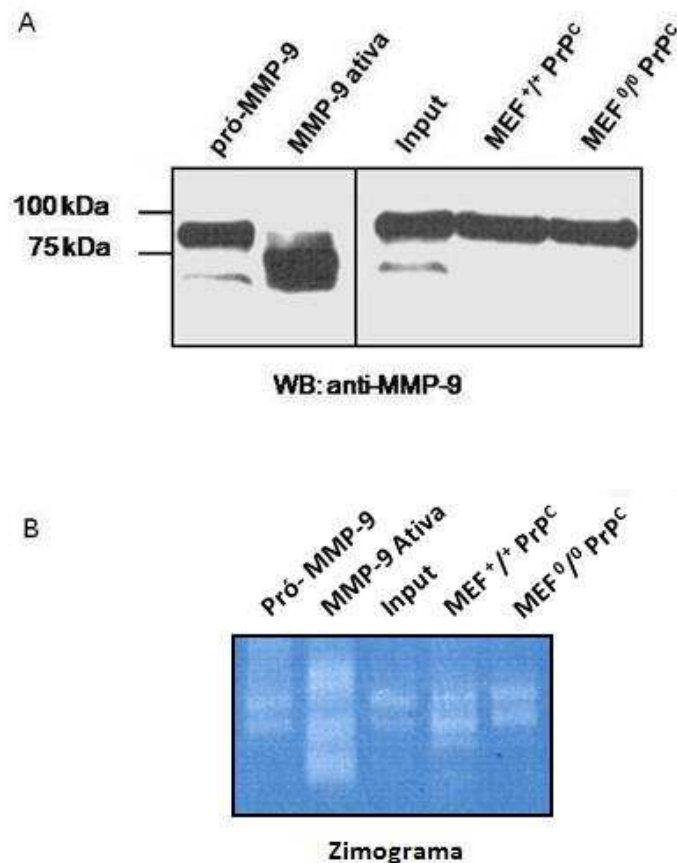


FIGURA 12 – PrP^C NÃO PARTICIPA DA ATIVAÇÃO DE MMP-9 EM CÉLULAS MEF
 A ativação de pró-MMP-9 com APMA foi eficaz, como evidenciado em ambos os ensaios. No *Western Blot* (WB) pode perceber-se que PrP^C não modula a ativação de pró-MMP-9, em células MEF. A MMP-9 ativa inicialmente presente no *input* não é detectada após incubação com os fibroblastos tipo selvagem ou nocaute. (A); No zimograma são detectadas as formas latentes e intermediárias de MMP-9 tanto no tempo 0 (*input*) quanto após incubação com qualquer uma das linhagens (B).

Se PrP^C participasse do processo de ativação diretamente ou através do sequestro do zimogênio seria esperada uma diferença na proporção de enzima latente e ativa entre as linhagens. No entanto, esta diferença não foi observada, nem por WB nem por zimografia. Curiosamente, em ambas as amostras, a pequena quantidade de enzima ativa que existia inicialmente no *input* desaparece (banda mais fraca de menor massa molecular), talvez devido ao clareamento de enzimas ativas mediado por LRP-1. Sabe-se que o balanço MMPs/TIMPs é rigorosamente controlado pelas células em condições fisiológicas, já que o desequilíbrio desta razão pode levar ao surgimento de várias patologias. PrP^C é endocitado constitutivamente, e LRP-1 parece ser um dos mediadores deste fenômeno. Então, durante este movimento de

internalização, a proteína príon celular também poderia ser responsável pelo clareamento das enzimas ativas após o término da sua função, visto que ambos usam o mesmo mediador, a proteína LRP-1. Porém, esta hipótese também é descartada pelos resultados deste experimento, uma vez que não foi encontrada uma diferença na quantidade de MMP-9 remanescente no meio de cultura após incubação com cada linhagem.

Dados na literatura tem mostrado o envolvimento de PrP^C em fenômenos de adesão célula-matriz (SCHROCK *et al.*, 2008; GRANER *et al.*, 2000a; HAJJ *et al.*, 2007) . Foi descrito que PrP^C regula a formação de adesão focal e extensão de filopódios em células de *Drosophila* S2 (SCHROCK *et al.*, 2008). Foi mostrado também que anticorpos anti-PrP^C inibem a adesão de células PC-12 em laminina (GRANER *et al.*, 2000a). A interação entre PrP^C e vitronectina parece mediar o crescimento axonal no sistema nervoso periférico (HAJJ *et al.*, 2007). Com base nestes pressupostos, decidimos, por fim, investigar se PrP^C poderia participar também da adesão célula-matriz de fibroblastos imortalizados.

Células MEF do tipo selvagem ou nocaute foram plaqueadas sobre uma matriz sólida de vitronectina, laminina, fibronectina e matrigel (um análogo da membrana basal) e a capacidade de ligação de cada linhagem foi avaliada através de ensaio de adesão (figura 13).

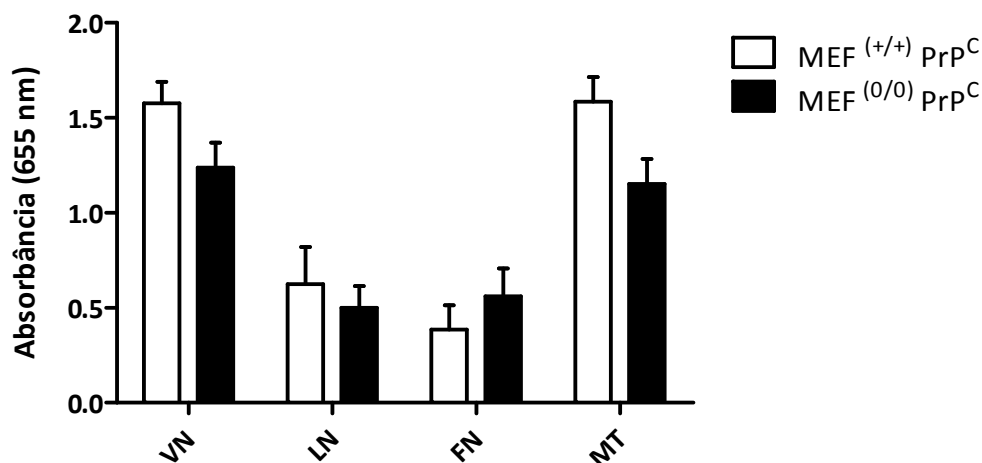


FIGURA 13 - PrP^C NÃO INFLUÊNCIA ADESÃO CÉLULA-MATRIZ EM MEFs. Células MEF foram deixadas aderir por 2h sobre diferentes moléculas de matriz. Como controle negativo foi utilizado BSA. A absorbância correspondente à adesão inespecífica sobre BSA foi descontada de todos os grupos experimentais. Em ambas as linhagens foi observado um aumento na adesão sobre vitronectina (VN) e matrigel (MT), em relação a laminina (LN) ou fibronectina (FN) ($p < 0,05$), no entanto não existe diferença significativa entre a adesão de células selvagem (+/+) ou nocaute (0/0) para a proteína príon celular sobre nenhum dos substratos testados ($p > 0,05$, ANOVA de uma via com pós teste de Tukey).

Ambas as linhagens demonstraram um comportamento muito semelhante no ensaio de adesão, sem que uma diferença significativa entre elas tenha sido encontrada. Neste ponto, este resultado era previsível, visto que MMPs são um dos principais mediadores fisiológicos dos fenômenos de adesão célula-matriz e migração celular (ZHAO *et al.*, 2001; GU *et al.*, 2002b; WANG *et al.*, 2010), e que pelos resultados obtidos anteriormente, a sua atividade parece ser independente de PrP^C neste modelo experimental. Novamente vale lembrar o viés de função redundante ou ativação de mecanismos compensatórios quando se trata do estudo da função de uma proteína em células nocauteadas.

Em uma observação mais cuidadosa, percebemos uma preferência de adesão de fibroblastos embrionários à proteína vitronectina e à matrigel. Sabendo que laminina é um dos principais componentes da membrana basal, e que a adesão neste substrato foi significativamente mais baixa do que em matrigel, podemos supor que a ligação ocorreu seletivamente com os outros componentes da membrana basal (perlecan, nidogênio ou colágeno tipo IV). Curiosamente, a adesão em fibronectina, a molécula que conecta o colágeno aos fibroblastos através de integrinas, foi significativamente mais baixa do que a

adesão em vitronectina ou matrigel. O significado neste resultado permanece obscuro.

Resumindo, podemos concluir que a expressão, clivagem do zimogênio, atividade gelatinolítica e internalização de MMP-9 é independente da proteína príon celular no modelo de estudo escolhido neste trabalho. Como esperado, a adesão célula-matriz também parece não ser afetada pela ausência de PrP^C.

5.2 EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE PrP^C NA ATIVIDADE DE MMP-9 EXÓGENA EM CÉLULAS HEK 293T

Anteriormente avaliamos o efeito PrP^C na expressão e atividade de MMP-9 em fibroblastos embrionários de camundongo do tipo selvagem ou nocaute para a proteína príon celular. Devido aos resultados negativos obtidos com esta abordagem experimental, passamos para um modelo de super-expressão de PrP^C e MMP-9 em células embrionárias de rim humano (HEK 293T), uma das poucas linhagens nas quais é possível utilizar o método de transfecção por precipitação de cálcio, um método simples, não tóxico e econômico. As células foram duplamente transfectadas com MMP-9 e PrP^C - 3F4 ou, como controle, o vetor pcDNA vazio, com objetivo de determinar se na presença de PrP^C super-expresso, MMP-9 teria sua atividade modulada. As amostras de meio de cultura de células HEK 293T transfectadas e condicionadas por 24, 48 ou 72h foram analisadas por WB e zimografia. Como controle da quantidade de proteínas aplicada em cada poço foi feita marcação para MMP-2, porém nesta linhagem a sua expressão está praticamente no limite de detecção da técnica. O meio de cultura foi também testado quanto à presença de PrP^C clivado ou secretado (figura 14).

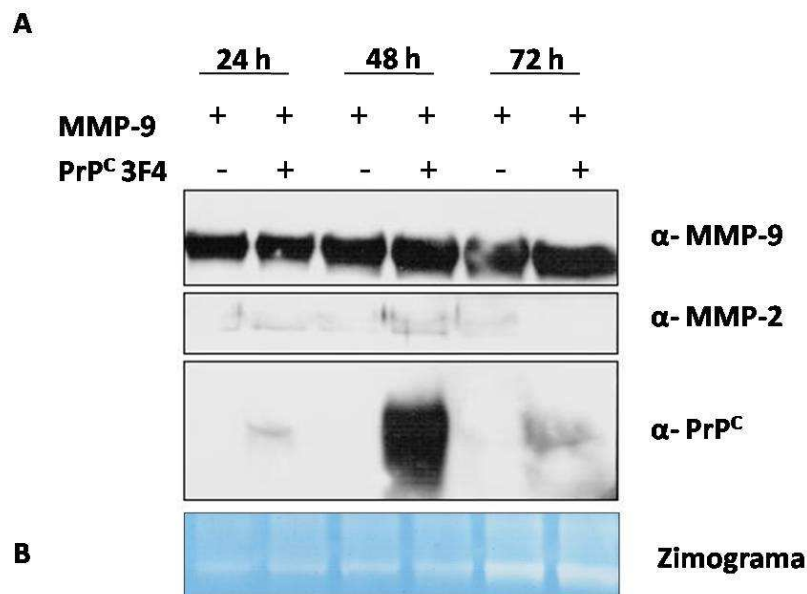


FIGURA 14 – A ATIVIDADE DE MMP-9 É INDEPENDENTE DA EXPRESSÃO DE PrP^C EM CÉLULAS HEK 293T. As células foram duplamente transfectadas com MMP-9 e PrP^C-3F4 ou vetor vazio (controle) e em seguida foram cultivadas por 24, 48 ou 72h em meio sem SFB. O sobrenadante do meio de cultura foi analisado quanto à presença de MMP-9 por *Western Blotting* (A) e por zimografia (B). Como controle do carregamento de proteínas foi utilizada marcação para MMP-2, no entanto a quantidade de enzima está quase além do limite de detecção. Foi detectada também a presença de PrP^C no meio de cultura, especialmente após 48h de transfecção. Em (B), as mesmas amostras foram submetidas a zimografia e corroboram os dados obtidos por WB. Existe um aumento da detecção de MMP-9 ao longo do tempo, sendo máxima 72h após transfecção. No entanto, a presença de PrP^C exógeno não influencia a atividade de MMP-9 em células HEK 293T.

A expressão e atividade de MMP-9 transfectada em células HEK aumentou ao longo do tempo, porém de forma independente da superexpressão concomitante de PrP^C. Curiosamente, foi detectado PrP^C no meio de cultura após 48h de condicionamento. A sua origem, porém, permanece desconhecida e merece uma investigação mais aprofundada. Sabe-se que PrP^C pode ser secretado e clivado da superfície por dois mecanismos independentes, um deles definitivamente mediado por uma protease (PARKYN *et al.*, 2004). É portanto de se imaginar que esta atividade possa ser mediada pela MMP-9. Infelizmente os resultados deste experimento não nos permitem concluir se de fato é o que acontece neste caso, uma vez que todas as células foram transfectadas com MMP-9 e que só o PrP^C exógeno é detectado no meio de cultura. Experimentos futuros serão planejados para abordar esta hipótese.

Concluindo, a superexpressão de PrP^C em células HEK 293T não modula a atividade de MMP-9.

5.3 EFEITO DO SILENCIAMENTO DO GENE *PRNP* QUE CODIFICA PrP^C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-9 EM CÉLULAS MDA-MB-435

Por último, decidimos tentar uma nova abordagem: RNA de interferência para o gene *PRNP* que codifica PrP^C, uma técnica que permite contornar o viés da utilização de células nocaute (HOLEN & MOBBS, 2004). Escolhemos a linhagem de tumor de mama MDA-MB-435 como modelo de estudo da possível interação entre MMP-9 e PrP^C. Uma vez que ambas as proteínas participam do processo de progressão tumoral este seria um dos ambientes nos quais um *cross-talk* entre MMP-9 e PrP^C teria relevância biológica.

Vários trabalhos têm descrito a presença de MMP-9 na linhagem MDA-MB-435 (DUFOR *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2008; BYUN *et al.*, 2006). Porém, ainda não foi investigada a presença da proteína príon celular. Por este motivo, inicialmente as células 435 foram caracterizadas quanto à expressão de PrP^C, através de imunoprecipitação e citometria de fluxo (figura 15).

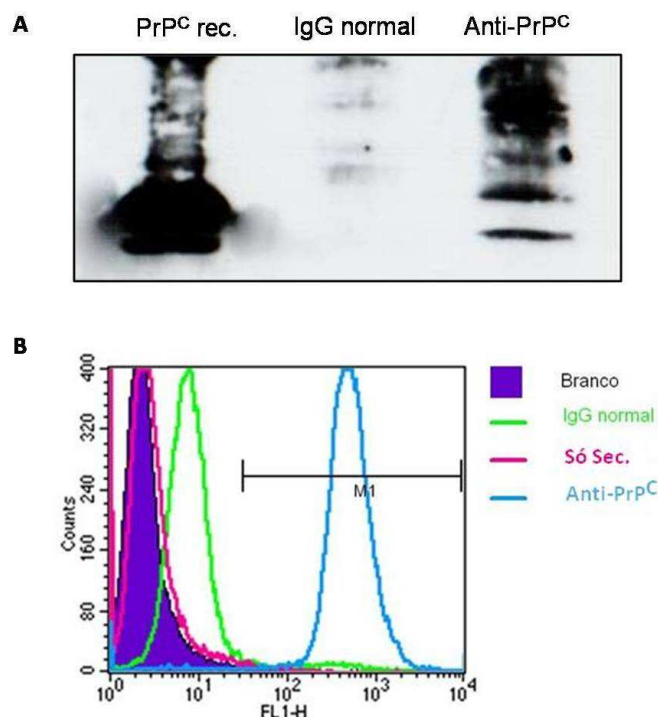


FIGURA 15 – CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PRP^C EM CÉLULAS MDA-MB-435. Células MDA-MB-435 foram caracterizadas quanto à expressão da proteína príon celular por imunoprecipitação (A) e citometria de fluxo (B). Para a imunoprecipitação, extrato de células MDA-MB-435 foi incubado com IgG normal de camundongo (controle negativo) ou anticorpos anti-PrP^C. O material imunoprecipitado foi analisado por *Western Blotting* com anti-PrP^C. Como controle positivo da reação de WB foi utilizado a proteína príon celular recombinante (PrP^C rec.). Para a citometria de fluxo, células MDA-MB-435 foram incubadas com IgG normal ou anticorpos anti-PrP^C e em seguida marcadas com anti-mouse Alexa 488. Como controle negativo uma amostra de células foi incubada apenas com o anticorpo secundário (Só Sec.). A população (apenas as células sem nenhuma marcação) foi utilizada como branco. Ambas as técnicas confirmam a expressão de PrP^C por células MDA-MB-435.

Podemos observar a presença da proteína príon celular na amostra de extrato de células MDA-MB-435 imunoprecipitada com anticorpos anti-PrP^C, o que não acontece na amostra reagida com IgG normal. Além disso, o resultado da citometria mostra uma marcação específica de PrP^C na superfície celular, ausente nas células incubadas apenas com anticorpo secundário ou com IgG normal de camundongo.

Uma vez confirmada a presença de PrP^C na linhagem celular de tumor de mama MDA-MB-435 foi possível dar início aos experimentos de silenciamento.

A eficiência de transfecção de células MDA-MB-435 com o reagente Lipofectamina foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o duplex de RNA

fluorescente TYE. Foi detectada fluorescência em 98% das células transfectadas (dados não mostrados). Uma vez estabelecida a capacidade de introduzir duplexes de RNA em células MDA-MB-435 com Lipofectamina, o duplex de RNA para silenciamento do gene que codifica PrP^C foi testado por qPCR e citometria de fluxo, 72h após a transfecção. Como controle foi utilizado o duplex *Scrambled*. Os resultados estão resumidos na tabela 7.

TABELA 7 – EFICIÊNCIA DO DUPLEX PARA INTERFERÊNCIA DO GENE *PRNP* QUE CODIFICA PrP^C

Amostra	Expressão Gênica	Técnica	Expressão Protéica	Técnica
<i>Scrambled</i>	1	qPCR	68,4%	Citometria de Fluxo
RNAi <i>PRNP</i>	0,2		49,4%	

Foi detectada uma pequena diminuição da quantidade de PrP^C na superfície celular de células silenciadas (27,7%), apesar do efeito expressivo do duplex de RNA na quantidade de mRNA (80%). Ainda assim achamos pertinente investigar o efeito do silenciamento de PrP^C na expressão de MMP-9 endógena em células tumorais, por PCR em tempo real (tabela 8).

TABELA 8 – EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-9 APÓS INTERFERÊNCIA DO GENE *PRNP* QUE CODIFICA PrP^C

Amostra	Expressão Gênica de MMP-9
<i>Scrambled</i> 24h	1
RNAi <i>PRNP</i> 24h	1,1
<i>Scrambled</i> 48h	1
RNAi <i>PRNP</i> 48h	1,04
<i>Scrambled</i> 72h	1
RNAi <i>PRNP</i> 72h	0,92

A diminuição de $\frac{1}{3}$ de PrP^C presente na superfície de células MDA-MB-435 parece não alterar a expressão gênica de MMP-9 em até 72h.

6. DISCUSSÃO

O comportamento celular é determinado pelos estímulos a que uma célula é exposta e pelos recursos que esta dispõe para responder a estes estímulos. Assim, para manter o equilíbrio necessário ao funcionamento normal do organismo, as células necessitam de diversas estratégias para garantir um controle rigoroso do ambiente externo (McCawley & Matrisian, 2001, Mott & Werb, 2004). Isso implica um monitoramento rígido das proteínas de superfície capazes de transduzir sinais para o interior da célula, como PrP^C, e das enzimas responsáveis por remodelar a arquitetura da MEC, como a MMP-9.

O presente trabalho procurou investigar se a expressão e atividade da metaloprotease-9 poderiam ser moduladas pela proteína príon celular. Para cumprir esse objetivo foram utilizadas três abordagens experimentais diferentes, em três linhagens celulares distintas: nocauteamento de PrP^C em fibroblastos, superexpressão de PrP^C em células embrionárias de rim HEK 293T e silenciamento de PrP^C em células tumorais MDA-MB-435. Os resultados aqui apresentados sugerem que a expressão (figura 9), atividade gelatinolítica (figura 10) e ativação da MMP-9 (figura 12) são independentes da proteína príon celular em células MEF. As moléculas de MEC vitronectina e fibronectina também não se mostraram hábeis em modular a capacidade de clivar gelatina de MMP-9 em células MEF (figura 10).

Nesta linhagem, a adesão com as moléculas de MEC laminina, vitronectina, fibronectina e matrigel também não parece ser prejudicada pela ausência de PrP^C (figura 13). Além disso, co-transfecção de PrP^C e MMP-9 em células HEK 293T também não alterou a quantidade ou atividade da gelatinase secretada por estas células (figura 14). Por último, silenciamento do gene que codifica a proteína príon celular em células tumorais da linhagem MDA-MB-435 não alterou a expressão gênica de MMP-9 (figura 18).

O corpo de evidências aqui apresentado levou-nos a concluir que, embora estas proteínas participem dos mesmos fenômenos (que vão desde memória e plasticidade sináptica até progressão tumoral) e partilhem proteínas ligantes (laminina, vitronectina, integrina $\alpha\beta3$, tPA, LRP-1), a sua regulação parece não estar diretamente relacionada. Estes resultados estão de acordo

com pelo menos quatro publicações independentes (SATOH *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2006; WURM *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2009).

Em um estudo comparativo do perfil genético de fibroblastos selvagens ou deficientes para PrP^C foi detectado, por microarranjo, que a presença da proteína príon celular estava associada a um aumento da expressão de uma única MMP, a MMP-11, uma estromelisina atípica (SATOH *et al.*, 2000). Estes dados foram confirmados posteriormente por PAN e colaboradores (2006) nessas mesmas células, também por microarranjo. Além disso, foi mostrado que o silenciamento do gene *PRNP* por RNA de interferência na linhagem de câncer de estômago SGC7901 levou a uma diminuição da expressão de MMP-11, mas não de MMP-2 ou MMP-9. Observaram ainda que PrP^C não só é superexpresso em câncer de estômago metastático, como ainda promove a capacidade adesiva, invasiva e metastática destas células tumorais. Propuseram então que estes efeitos regulados por PrP^C seriam mediados por MMP-11, e desencadeados pela via de sinalização da ERK 1/2 (PAN *et al.*, 2006).

Recentemente estes dados foram confirmados por outro grupo de pesquisa (LI *et al.*, 2009). Neste trabalho foi utilizada a linhagem de tumor de mama MCF-7 e a sua correspondente com resistência a múltiplas drogas (MCF-7/Adr). O objetivo era caracterizar a interação entre PrP^C e a P-glicoproteína (P-gp), uma bomba de extrusão de amplo espectro que reconhece diversos agentes quimioterapêuticos. Eles mostraram que tratamento de células MCF-7/Adr com o agente anti-tumoral paclitaxel induz invasão celular através da interação PrP^C/P-gp. Este efeito foi abolido em células com a expressão de PrP^C silenciada ou em células com a função de P-gp bloqueada por anticorpo. O mais interessante é que, quando PrP^C foi superexpresso em células MCF-7, o potencial invasivo destas células e a expressão de MMP-11 também aumentou. Além disso, a capacidade de invasão destas células foi significativamente diminuída na presença de anticorpos anti-MMP-11 (LI *et al.*, 2009). Todos estes trabalhos mostraram o envolvimento de PrP^C na modulação de uma metaloprotease, a MMP-11 (SATOH *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2009) mas não da MMP-9 (PAN *et al.*, 2006).

Os nossos resultados, porém, não corroboram o trabalho de Pradines e colaboradores (2008). Neste estudo foram utilizadas a linhagem de células neuroectodermis indiferenciadas 1C-11 e seus derivados neuronais com fenótipo serotoninérgico (1C-11^{5-HT}) e noradrenérgico (1C-11^{NE}). Foi mostrado, por PCR convencional, que tratamento destas células com anticorpos anti-PrP^C por apenas 3h é suficiente para diminuir a expressão gênica de MMP-9 e aumentar a expressão de TIMP-1, o seu inibidor fisiológico. Na sequência, a expressão de MMP-9 foi induzida por ésteres de forbol em células 1C-11^{5-HT} e 1C-11^{NE} e foi monitorado o surgimento de fragmentos de 30 kDa de β -Distroglican. Foi observado que a clivagem desta proteína é inibida por anticorpos anti-PrP^C e por um inibidor específico de MMP-9 (PRADINES *et al.*, 2008). β -Distroglican é uma proteína transmembrana que, de forma semelhante às integrinas, conecta o meio extracelular ao citosqueleto da célula. A sua clivagem, portanto, afeta a adesão celular. Foi mostrado recentemente que β -Distroglican é um alvo de MMP-9 em resposta à atividade neuronal (MICHALUK *et al.*, 2007) e que β -Distroglican se associa com PrP^C no sistema nervoso central (KESHET *et al.*, 2000).

Portanto, a sequência de eventos proposta por Pradines e colaboradores parece bastante razoável. Infelizmente ainda não foi descrito o sinal que desencadearia esse efeito, mimetizado pela utilização de um anticorpo. Quando for descoberta a identidade dessa molécula, seria possível testar o seu efeito nos modelos experimentais empregados no presente trabalho. A diferença entre os resultados obtidos por nós e os descritos por este grupo podem ser explicados pelas linhagens celulares utilizadas (não neuronais vs neuronais) e pela abordagem experimental (modulação da expressão de PrP^C vs sinalização mediada por anticorpo).

Novamente vale lembrar o risco associado à utilização de linhagens nocaute para estudo da função de uma proteína, nas quais a ausência de um fenótipo grosseiro não significa necessariamente que a molécula em questão seja dispensável. Grande expectativa cercou o surgimento dos primeiros animais nocaute para PrP^C. Especulou-se que a ausência desta proteína de expressão ubíqua, altamente conservada evolutivamente, cujo dobramento incorreto dá origem a patologias tão severas, deveria causar um sério prejuízo ao funcionamento de um organismo. Foi então com grande surpresa que

Bueler e colaboradores (1992), responsáveis pela criação dos primeiros animais nocaute para PrP^C por recombinação homóloga em células tronco embrionárias (Zurich I) , relataram que estes camundongos apresentavam desenvolvimento e comportamento normal, pelo menos até aos 7 meses de idade. Não foram detectadas anormalidades anatômicas no encéfalo, músculo esquelético ou órgãos viscerais nem problemas imunológicos. A aprendizagem também não foi prejudicada (BUELER *et al.*, 1992). Infelizmente estes animais são provenientes do cruzamento de duas linhagens C57BL/6J vs 129/SV, e este *background* misto tem se revelado uma barreira à interpretação de outros experimentos, especialmente relacionados com o comportamento destes animais (LINDEN *et al.*, 2008).

Uma segunda linhagem de animais nocaute foi produzida posteriormente, conhecida como Edinburg (Edbg), através do cruzamento de animais com o mesmo *background* genético (129/Ola). Porém, estes camundongos também não apresentaram nenhuma alteração grosseira durante a sua embriogênese, nem desenvolveram patologias severas em idades mais avançadas (MANSON *et al.*, 1994).

Os autores da estirpe ZurichI propuseram várias hipóteses para explicar o fenótipo normal inesperado: é possível que o efeito da perda de um gene seja tão sutil que uma desvantagem seletiva só se torna evidente depois de muitas gerações, provavelmente sob condições ambientais estressantes. Outra possibilidade é que a função da proteína em falta seja assumida por proteínas relacionadas, ou que a sua função seja redundante. Por último, sugeriram ainda que é razoável pensar que uma proteína anteriormente necessária pode não mais servir uma função e a sua conservação não é resultado de pressão seletiva, mas sim de inércia evolutiva (BUELER *et al.*, 1992).

Mais tarde, três novas estirpes de animais nocaute foram geradas, Nagasaki, Rcm0 e Zurich II, e estas desenvolveram ataxia e morte de células de Purkinje. A discrepância entre os resultados obtidos com os animais Zrch I e Edbg só foi resolvida com a descoberta de um novo gene (*PRND*), que codifica a proteína Doppel. Nestas três linhagens, a deleção de PRNP colocou o gene *PRND* sob o promotor de PrP^C, o que resultou em transcritos quiméricos e superexpressão de Doppel no encéfalo. O motivo pelo qual superexpressão de Doppel é deletério ainda não foi esclarecido, mas parece que esta proteína

exacerba o dano oxidativo, antagonizando a função antioxidante de PrP^C (AGUZZI *et al.*, 2008). A linhagem de células MEF nocaute utilizada neste trabalho é proveniente de animais descendentes da estirpe Zrch I. A linhagem selvagem foi obtida pelo cruzamento de descendentes F1 do acasalamento de animais C57BL/6J e 129/SV (MURAS *et al.*, 2009).

Se de fato a função de PrP^C é redundante ou a sua falta foi superada pela ativação de mecanismos compensatórios nestas células, de tal forma que nenhum efeito deletério proeminente foi detectado nos animais nocaute, isto poderia explicar a ausência de um efeito na expressão e na atividade da MMP-9 observada no presente trabalho. Por exemplo, foi relatado que a ausência de PrP^C é compensada por um aumento da expressão e ativação de integrina $\alpha\beta 3$ (MURAS *et al.*, 2009). Já é descrito na literatura que integrinas podem modular a expressão de MMPs, ao regular a estabilidade do seu mRNA (IYER *et al.*, 2005) ou participando da sua ativação (HOFMANN *et al.*, 2000a; HOFMANN *et al.*, 2000b; DERYUGINA *et al.*, 2001; ROLLI *et al.*, 2003). Portanto, o envolvimento de integrinas na modulação da atividade de MMP-9 neste modelo experimental deverá ser abordado em experimentos futuros.

Para contornar as limitações da utilização de linhagens nocaute construímos uma nova ferramenta, RNA de interferência. Esta abordagem permite silenciar a expressão de um gene sem manipular o DNA genômico e assim investigar a sua função. É especialmente atraente porque além de não estar sujeita a uma influência tão forte de mecanismos compensatórios como o nocauteamento de genes, que dificultam a interpretação de resultados, provê um sistema mais econômico, rápido e eficaz do que a utilização de oligonucleotídeos *antisense* (HOLEN & MOBBS, 2004).

No entanto, quando transfectamos células tumorais com um duplex de RNA para silenciamento do gene que codifica PrP^C verificamos que, mesmo em um contexto onde a interação destas duas proteínas teria acentuada relevância biológica, não foi observada uma alteração significativa da expressão gênica de MMP-9. É possível que a eficiência do RNAi utilizado tenha comprometido o resultado final, uma vez que, apesar da expressão do mRNA ter sido reduzida em até 78%, a quantidade de proteínas presentes na superfície celular só diminuiu 27,7% (tabela 6).

Esta é uma característica dos duplexes de RNA: eles apresentam uma variação natural extrema na capacidade de silenciar a expressão de um gene (HOLEN & MOBBS, 2004). Por exemplo, dependendo da construção escolhida e concentração utilizada, Kim e colaboradores (2009) encontraram valores de silenciamento da expressão de PrP^C que variaram desde 7% a 99%. O mesmo problema foi relatado em diversos outros trabalhos que utilizaram este método para estudar a função da proteína príon celular (DU *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2009). Para eliminar esta hipótese como sendo responsável pelos resultados obtidos neste trabalho, outras construções de RNAi deverão ser testadas, em diferentes concentrações, quanto à sua eficiência em diminuir a expressão de PrP^C tanto no nível de RNA mensageiro quanto no nível protéico. O duplex que apresentar valores ótimos de inibição deverá então ser testado quanto ao seu efeito sobre a expressão de MMP-9 em células MDA-MB-435 e, se possível, em linhagens de neuroblastoma e glioblastoma, onde as proteínas de interesse desempenham importantes funções fisiológicas e patológicas.

Como já foi demonstrado por Pradines e colaboradores (2008), PrP^C e MMP-9 estão intimamente associados ao processamento proteolítico de β -Distroglican nas linhagens neuronais 1C-11^{5-HT} e 1C-11^{NE}. O que levanta outro ponto que é importante ressaltar: neste trabalho só foi avaliado o efeito de PrP^C sobre a atividade gelatinolítica da MMP-9, mas vale lembrar que esta enzima é capaz de clivar uma ampla gama de moléculas de matriz, fatores de crescimento e citocinas (McCawley & Matrisian, 2001, Mott & Werb, 2004).

É possível que PrP^C influencie a capacidade da MMP-9 clivar TNF- α ou TGF- β , por exemplo. Wurm & Wechselberger (2006) mostraram que PrP^C modifica a transdução de sinal induzida por TGF- β . Neste trabalho foi evidenciado que superexpressão de PrP^C em células epiteliais de glândula mamária de camundongo modula sinais transduzidos por TGF- β via MAPK e leva a um aumento da expressão e atividade de MMP-2 e uma ligeira diminuição de MMP-9. Estes resultados exemplificam a importância de avaliar o efeito de PrP^C sobre outros substratos da MMP-9 em experimentos futuros. Aliás, a própria proteína príon celular pode ser um alvo da MMP-9. Esta questão ficou em aberto e merece uma atenção especial.

A presença de PrP^C no meio de cultura de células HEK 293T transfectadas sugere que este tenha sido secretado ou alvo de *shedding*. Este poderia ser um mecanismo de retroalimentação negativo utilizado pelas células para bloquear vias de sinalização desencadeadas por interação de PrP^C com os seus ligantes. Futuramente, outros experimentos poderão ser direcionados para testar esta hipótese.

Como um todo, parece seguro afirmar que a proteína príon celular não exerce influência sobre a capacidade da metaloprotease 9 degradar colágeno IV desnaturado. Este efeito foi avaliado neste trabalho em duas linhagens diferentes, através de dois métodos distintos: ensaio de atividade gelatinolítica baseado em microplaca e zimografia.

O ensaio de atividade gelatinolítica difere em muitos aspectos da zimografia e por isso os dois se complementam, providenciando uma gama maior de informações. Por exemplo, o primeiro utiliza gelatina biotinizada solúvel como substrato, incubado diretamente com as amostras de meio de cultura. Outras proteases secretadas pela célula ou inibidores de MMPs também podem estar presentes e interferir na reação de digestão. Também não é possível distinguir a enzima responsável pela atividade gelatinolítica observada (MMP-2 ou MMP-9) sem o auxílio de inibidores específicos para cada uma delas. Além disso, não é detectada a presença de pró-enzimas, uma vez que, em condições nativas, estas ainda não são capazes de digerir gelatina.

Sabendo que a quantidade de MMPs ativas em condições fisiológicas é muito baixa, a porcentagem de substrato digerido raramente é muito alta (valores em torno de 30% de digestão foram encontrados neste trabalho). No entanto, este ensaio provê um sistema sensível, prático e eficiente para avaliação de atividade gelatinolítica. É mais rápido do que o tradicional zimograma e é capaz de detectar atividade de MMP-2 em concentrações tão baixas quanto 0,16 ng/ml (RATNIKOV *et al.*, 2000). Permite também detectar diferenças na quantidade de TIMPs presentes em cada amostra e mimetiza uma situação mais próxima ao que ocorre *in vivo*. Ainda, tanto a enzima quanto o seu substrato estão solúveis, permitindo que a interação entre os dois ocorra livremente em múltiplas frentes.

Por outro lado, a zimografia é um método simples, econômico, amplamente usado e altamente sensível, que pode detectar até 10 pg de MMP-2 (FREDERIKS & MOOK, 2004; KUPAI *et al.*, 2010). Esta técnica emprega uma matriz imobilizada de gelatina e acrilamida, o que limita a interação enzima/ substrato a um local específico, correspondente à migração eletroforética da gelatinase. Além disso, diminuí a exposição dos “epítomos” do substrato reconhecidos pelo sítio ativo da enzima como sequências passíveis de sofrerem clivagem. No entanto, devido à desnaturação da enzima na presença de SDS o pró-domínio é deslocado do zinco catalítico, o que ativa as pró-enzimas e permite que estas também degradem a gelatina. Desta forma o limite de detecção deste ensaio é consideravelmente ampliado. Também é possível distinguir MMP-2 e MMP-9, tanto na forma latente quanto ativa, devido à diferença de massa molecular entre cada uma. Outras proteases contaminantes também podem ser detectadas. Com o auxílio de variantes desta técnica também é possível detectar a presença de TIMPs (zimografia reversa) ou outras MMPs (zimograma de caseína por exemplo) (FREDERIKS & MOOK, 2004; KUPAI *et al.*, 2010).

Contudo, mesmo utilizando dois métodos complementares e avaliando o efeito de PrP^C sobre a atividade de MMP-9 tanto em condições basais quanto após estimulação com moléculas de matriz não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, o que reforça a verossimilhança dos dados aqui apresentados. Nos modelos experimentais que utilizamos, PrP^C também parece não participar da ativação de pró-MMP-9 ou de sua internalização, como sugerem os resultados da figura 12. Face a este conjunto de evidências, se tornou previsível que a adesão célula-matriz de fibroblastos imortalizados não fosse perturbada pela ausência de PrP^C, visto que a atividade de MMP-9 também não foi afetada. O reconhecimento e remodelamento das moléculas presentes no seu microambiente são etapas importantes da migração celular, invasão e metástase (McCRAWLEY & MATRISIAN, 2001, MOTT & WERB, 2004). A secreção de MMPs e TIMPs já foi implicada em todos estes processos, tanto por células tumorais quanto por células do estroma, como fibroblastos, recrutados para o interior de neoplasias (COUSSENS *et al.*, 2002).

Seria interessante avaliar também o efeito de PrP^C sobre a expressão de TIMPs, que regulam inúmeras atividades biológicas de forma dependente ou

não da sua função de inibição de MMPs. Alternativamente, é possível determinar se existe alguma forma de comunicação entre a proteína RECK e PrP^C, ambas glicoproteínas de membrana ancoradas por GPI. Desta forma PrP^C poderia regular indiretamente a atividade da MMP-9, ao modular a abundância de um dos seus inibidores fisiológicos.

Também seria importante verificar o perfil de expressão de outras MMPs, como a MMP-11, em células nocateadas ou silenciadas para a proteína príon celular. A interação entre as proteínas objeto deste estudo deveria também ser investigada no sistema nervoso central, em culturas primárias de neurônios ou linhagens imortalizadas. Por último, a existência de uma relação funcional entre estas moléculas poderia ser analisada em células tumorais, avaliando a capacidade invasiva e metastática das mesmas após manipulação experimental de uma das proteínas em estudo, PrP^C ou MMP-9.

Resumindo, o presente trabalho deu origem a várias ferramentas de estudo como plasmídeos, oligonucleotídeos iniciadores e duplexes de RNA, que serão úteis para responder às perguntas e hipóteses aqui levantadas e ainda não completamente elucidadas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que:

- A expressão, clivagem do zimogênio e atividade gelatinolítica de MMP-9 é independente da proteína príon celular em fibroblastos embrionários imortalizados;
- Células MEF aderem preferencialmente a vitronectina e componentes da lâmina basal (matrigel), quando comparado com fibronectina ou laminina apenas. Nestas células, a adesão célula-matriz parece ser independente da proteína príon celular.
- Superexpressão de PrP^C não modula a atividade de MMP-9 exógena em células HEK 293T;
- Silenciamento do gene que codifica PrP^C em células tumorais MDA-MB-435 parece não alterar a expressão gênica de MMP-9;

Resumindo, podemos concluir que a expressão e/ou atividade de MMP-9 parece ser independente da ausência, superexpressão ou silenciamento da proteína príon celular *in vitro*, nas condições experimentais testadas neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUZZI, A.; BAUMANN, F.; BREMER, J. The prion's elusive reason for being. **Annual Reviews in Neuroscience**, v.31, p. 439-477, 2008.

ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula* 5ed. **Artmed**, 2008.

AL-HAZMI, N. *et al.* The 120 kDa fragment of fibronectin up-regulates migration of $\alpha\beta 6$ -expressing cells by increasing matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 115, p. 454-458, 2007.

BERGERS, G. *et al.* Matrix metalloproteinase -9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. 737-744, 2000.

BODAZGI, O. *et al.* In Vivo Roles for Matrix Metalloproteinase-9 in Mature Hippocampal Synaptic Physiology and Plasticity. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, p. 334-344, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annal Biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1803, p. 55-71, 2010.

BRINCKERHOFF, C.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 207-214, 2002.

BROWN, D.R. *et al.* The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature**, v. 390, p. 684-687, 1997.

BROWN, D. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. **Trends in Neuroscience**, v.24, n.2, p. 85-90, 2001.

BÜELER, H. *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v.356, p. 577-582, 1992.

BÜELER, H. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v.73, p1339-1347, 1993.

BYUN, H.J. A of splice variant CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways. **J. Bio. Chem.**, v. 281(46), p. 34833-47, 2006.

CAMPANA, V.; SARNATARO, D.; ZURZOLO, C. The highways and byways of prion protein trafficking. **Trends in Cell Biology**, v.15, n.2, p. 102-111, 2005.

CHAILLAN, F.A. *et al.* Involvement of tissue inhibition of metalloproteinases-1 in learning and memory in mice. **Behavioural Brain Research**, v.173, p. 191-198, 2006.

CHEMICON INTERNACIONAL. **MMP gelatinase activity assay kit**. Cat. No. ECM701. Disponível em: <www.chemicon.com>. Acesso em 2008.

CHEN, S. *et al.* Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 22, p. 227-233, 2003.

CHETTY, C. *et al.* MMP-2 alters VEGF expression via $\alpha\beta 3$ integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 127, n°5, p. 1081-95, 2010.

CHIARINI, L.B. *et al.* Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **The EMBO Journal**, v. 21, p.3317-3326, 2002.

CHIRCO, R. *et al.* Novel Functions of TIMPs in cell signaling. **Cancer Metastasis Review**, v. 25, p. 99-113, 2006.

CLARK, J.C. *et al.* RECK-a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 26, n° 3-4, p. 675-83, 2007.

COITINHO, A.S. *et al.* The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v.24, p.3255-3264, 2006.

COITINHO, A.S. *et al.* Short-term memory formation and long-term memory consolidation is enhanced by cellular prion association with stress-inducible protein-1. **Neurobiol. Dis.**, v.26, p. 282-290, 2007.

COSTA, M. D. M. *et al.* Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v.461, p.16-20, 2009.

COUSSENS, L.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, v. 295, p. 2387-2392, 2002.

DAS, S. *et al.* Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 31-40, 2003.

DAS, S. *et al.* Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cell (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. **Life Sciences**, v.82, p. 467-476, 2008.

DELANY, A.M. *et al.* Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. **J. Bio. Chem.**, v. 270, p. 26607-26617, 1995.

DERYUGINA, E. *et al.* MT1- MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha\beta 3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 263, p. 209-223, 2001.

DI GUGLIELMO, G.M. *et al.* Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signaling and turnover. **Nature Cell Biology**, v.5, p. 410-421, 2003.

DU, J. *et al.* Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. **Int. J. Cancer**, v. 113, p. 213-220, 2005.

DUFOUR, A. *et al.* Role of the Hemopexin Domain of Matrix Metalloproteinases in Cell Migration. **Journal of Cell Physiology**, v. 217, p.643-651, 2008.

DUFOUR, A. *et al.* Role of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) dimers in cell migration: design of inhibitory peptides. **J Bio Chem**, v.285, n° 46, p.35944-35956, 2010.

DZWONEK, J.; RYLSKI, M.; KACZMAREK, L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. **FEBS Letters**, v.567, p. 129-135, 2004.

ERMONVAL, M. *et al.* Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. **Biochimie**, v. 85, p. 33-45, 2003.

ESPARZA, J. *et al.* Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocytes cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. **Blood**, v.94, n°8, p. 2754-2766, 1999.

FREDERIKS, W.M.; MOOK, O.R.F. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.52, n°6, p. 711-722, 2004.

GAUCZYNSKI, S. *et al.* The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 5863-5875, 2001.

GRANER, E. *et al.* Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Molecular Brain Research**, v.76, p. 85-92, 2000a.

GRANER, E. *et al.* Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Letters**, v. 482, p. 257-260, 2000b.

GROSS, J.; LAPIÈRE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **PNAS**, v. 48, p. 1014-22, 1962.

GU, Z. *et al.* S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. **Science**, v. 297, p. 1186-90, 2002a.

GU, J.; NISHIUCHI, R.; SEKIGUCHI, K. Matrix metalloproteinase-2 is involved in A549 cell migration on laminin-10/11. **BBRC**, v. 296, p. 73-77, 2002b.

GU, Z. *et al.* A Highly Specific Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-9 Rescues Laminin from Proteolysis and Neurons from Apoptosis in Transient Focal Cerebral Ischemia. **Neurobiology of Disease**, v. 25(27), p. 6401-6408, 2005.

HAIJ, G. M. *et al.* Integrins compensate PrP^C interaction with vitronectin to support axonal growth. **Journal of Cell Science**, v. 120, p. 1915-1926, 2007.

HOFMANN, U.B. *et al.* Expression of integrin $\alpha\beta 3$ correlates with activation of membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase - 2 (MMP-2) in human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*. **Int. J. Cancer**, v.87, p. 12-19, 2000a.

HOFMANN, U.B. *et al.* Coexpression of integrin $\alpha\beta 3$ and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.115, n°4, p. 625-632, 2000b.

HOLEN, T.; MOBBS, C.V. Lobotomy of genes: use of RNA interference in neuroscience. **Neuroscience**, v.126, p. 1-7, 2004.

HOOPER, N.M.; TAYLOR, D.R.; WATT, N.T. Mechanism of metal-mediated endocytosis of the prion protein. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 1272-76, 2008.

INVITROGEN. **Block -it RNAi designer**. Disponível em: <<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>>. Acesso em 01/06/2010

IYER, V.; PUMIGLIA, K.; DiPERSIO, M. $\alpha 3\beta 1$ integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 1185-95, 2005.

JIANG, Y.; GOLBERG, I.D.; SHI, Y.E. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. **Oncogene**, v. 21, p. 2245-2252, 2002.

JOURQUIN, J. *et al.* Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainite. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p.1507-1517, 2003.

KESHET, G.I. *et al.* The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1889-1897, 2000.

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

KHOSRAVANI, H. *et al.* Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. **Journal of Cell Biology**, v. 181, p. 551-565, 2008.

KIM, G. W. *et al.* The role of MMP-9 in integrin-mediated hippocampal cell death after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of Disease**, v. 36, p. 169-180, 2009.

KUPAI, K. *et al.* Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n° 2, p. 205-209, 2010.

LAMBERT, E. *et al.* TIMPs as multifacial proteins. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, p. 187-198, 2004.

LAMPERT, K. *et al.* Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Brain Tumors. **American Journal of Pathology**, v. 153, p. 429-439, 1998.

LAROCHE-PIERRE, S.; JODOIN, J.; LeBLANC, A.C. Helix 3 is necessary and sufficient for prion protein's anti-Bax function. **Journal of Neurochemistry**, v.108, p. 1019-1031, 2009.

LETOURNEAU, P. C.; CONDIC, M. L.; SNOW, D. M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. **The Journal of Neuroscience**, v. 14(3), p. 915-928, 1994.

LEE, K.S., *et al.* Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 79-87, 2001.

LI, Q.Q. *et al.* The role of P-glycoprotein/cellular prion protein interaction in multidrug-resistant breast cancer cells treated with paclitaxel. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 504-515, 2009.

LIANG, J. *et al.* Hypoxia induced overexpression of PrP(C) in gastric cancer cell lines. **Cancer Biol. Ther.**, v. 6, p. 767-774, 2007.

LIMA, F.R. *et al.* Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v.103, p. 2164-2176, 2007.

LINDEN, R. *et al.* Physiology of Prion Protein. **Physiology Reviews**, v. 88, p. 673-728, 2008.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LIU, C.H.; WU, P.S. Characterization of matrix metalloproteinase expressed by human embryonic kidney cells. **Biotechnol. Lett.**, v.28, p. 1725-1730, 2006.

LOPES, M. H. *et al.* Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p. 11330-11339, 2005.

LUQUE, A.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; CABANAS, C. Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD49) by divalent cations and stimulatory $\beta 1$ antibodies. **FEBS Letters**, v. 346, p. 278-284, 1994.

LU, N. Endostar suppresses invasion through downregulating the expression of matrix metalloproteinase-2/9 in MDA-MB-435 human breast cancer cells. **Exp. Biol Med**, v.233(8), p.1013-20, 2008.

MALLA, N. *et al.* Biological and Pathological Functions of Gelatinase Dimers and Complexes. **Connective Tissue Research**, v. 49, p. 180-184, 2008a.

MALLA, N. *et al.* Interaction of pro- Matrix Metalloproteinase-9/Proteoglycan Heteromer with Gelatin and Collagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283 (20), p. 13652-665, 2008b.

MANGÉ, A. *et al.* PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells. **FEBS Letters**, v. 514, p.159-162, 2002.

MANGÉ, A. *et al.* Alpha- and beta-cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. **Bio. Cell.**, v.96, p. 125-132, 2004.

MANSON, J.C. *et al.* 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Molecular Neurobiology**, v.8 n°2-3, p. 121-127, 1994.

MARTINS, V.R. *et al.* Prion Protein: Orchestrating Neurotrophic Activities. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 12, p. 63-86, 2010.

MASKOS, K.; BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Molecular Biotechnology**, v. 25, p. 241-266, 2003.

MASSOVA, I. *et al.* MMPs: Structures, Evolution and Diversification. **The FASEB Journal**, v.12, p. 1075-1095, 1998.

MATRISIAN, L. M. The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays**, v.14, n.7, p. 455-463, 1992.

McCawley, L. J.; Matrisian, L.M. Matrix Metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, p.534-540, 2001.

Mehrpour, M. *et al.* Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumour necrosis factor alpha-induced cell death. **Cancer Research**, v. 64, p.719-727, 2004.

Mehrpour M.; Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology. **Cancer Letters**, v. 290, n° 1, p. 1-23, 2009.

Meighan, S. E. *et al.* Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. **Journal of Neurochemistry**, v.96, p. 1227-1241, 2006.

Meighan, S. E. *et al.* Effects of matrix metalloproteinase inhibition on short- and long – term plasticity of Schaffer collateral/CA-1 synapses. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, p.2085-2096, 2007.

Meslin, F. *et al.* Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death. **Cancer Research**, v.67, p.10910-10919, 2007a.

Meslin, F. *et al.* Efficacy of adjuvant chemotherapy according to prion protein expression in patients with estrogen receptor-negative breast cancer. **Ann. Oncol.**, v.18, p. 1793-1798, 2007b.

Michaluk, P. *et al.* β -Dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, n° 22, p. 16036-16041, 2007.

Mott, J.D.; Werb, Z. Regulation of Matrix Biology by Matrix Metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p.558-564, 2004.

Moulliet-Richard, S. *et al.* Signal Transduction through prion protein. **Science**, v.289, p. 1925-1928, 2000.

Muras, A. G. *et al.* Prion protein ablation increases cellular aggregation and embolization contributing to mechanisms of metastasis. **Int. J. Cancer**, v. 127, n°7, p. 1523-1531, 2009.

Murphy, G.; Crabbe, T. Gelatinases A and B. **Methods Enzymology**, v.248, p. 470-495, 1995.

Murphy, G.; Nagase, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v.29, p. 290-308, 2008.

Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v.69, p. 562-573, 2006.

Nagy, V.; Bozdagi, O.; Huntley, G.W. The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory. **Learning and Memory**, v.14, p. 655-664, 2007.

Nicolas, O.; Gavín, R.; Del Río, J.A. New insights into cellular prion protein (PrP^C) functions: “ying and yan” of a relevant protein. **Brain Research Reviews**, v.61, p.170-184, 2009.

OH, L.Y.S. *et al.* Matrix Metalloproteinase-9/Gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 19(9), p. 8464-8475, 1999.

OH, J. *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, v.107, n° 6, p. 9062-9, 2004.

OVERALL, C.M. Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. **Matrix Metalloproteinase Protocols**, p. 79-120, NG: Humana, 2001

OVERALL, C.M. *et al.* Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72 kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- β 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase gene expression. **J. Bio. Chem.**, v.266, p. 14064-14071, 1991.

PAN, Y. *et al.* Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. **The FASEB Journal**, v. 20, p. 1205-1215, 2006.

PARKIN, E.T. *et al.* Dual Mechanisms for Shedding of the Cellular Prion Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 11170–11178, 2004.

PARKIN, E.T. *et al.* LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. **Journal of Cell Science**, v. 121, p.773-783, 2008.

PAULY, P.C.; HARRIS, D.A. Cooper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 33107-33110, 1998.

PERERA, W.S.; HOOPER, N.M. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octapeptide region. **Current Bio.**, v. 11, p. 519-523, 2001.

PETERS, P.J. *et al.* Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, p. 703-717, 2003.

POUYSSÉGUR, J.; DAYAN, F.; MAZURE, N.M. Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumour regression. **Nature**, v. 441, p. 437-443, 2006.

PRADINES, E. *et al.* CREB-dependent gene regulation by prion-protein: Impact on MMP-9 and β -dystroglycan. **Cellular Signalling**, v.20, p. 2050-2058, 2008.

PRUSINER, S.B. Prions. **PNAS**, v. 95, p. 13363-13383, 1998.

PRUSINER, S.B. *et al.* Prion protein biology. **Cell**, v. 93, p. 337-348, 1998.

PÜSCHEL, A.W.; ADAMS, R. H.; BETZ, H. Murine semaphoring D/ Collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. **Neuron**, v. 14, p. 941-948, 1995.

RADISKY, E. S.; RADISKY, D. C. Matrix Metalloproteinase –induced epithelial mesenchymal transition in breast cancer. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v.15, p. 201-212, 2010.

RATNIKOV, B. *et al.* Determination of Matrix Metalloproteinase Activity Using Biotinylated Gelatin. **Analytical Biochemistry**, v. 286, p.149-155, 2000.

ROLLI M. *et al.* Activated integrin $\alpha v \beta 3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulation migration of metastatic breast cancer cells. **PNAS**, v.100 n. 16 p.9482-9487, 2003.

SANTUCCIONE, A. *et al.* Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{l^yn} and enhance neurite outgrowth. **The Journal of Cell Biology**, v. 169, p. 341-354, 2005.

SATO, H. TAKINO, T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. **Cancer Science**, v. 101, n° 4, p. 843-847, 2010.

SATOH, J.; KURUDA, Y.; KATAMINE, S. Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. **Am. J. Pathol.**, v. 157, p. 59-68, 2000.

SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analysing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**, v.3, n°6, p. 1101-1108, 2008.

SCHMITT-ULMS, G. *et al.* Time controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of proteins interaction in complex tissues. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 724-731, 2004.

SCHROCK, Y.; SOLIS, G.P.; STUERMER, C.A.O. Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrP^C). **FEBS Letters**, v. 583, p. 389-393, 2009.

SEO, D.W. *et al.* TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: a MMP-independent mechanism. **Cell**, v. 114, p. 171-180, 2003.

SHYNG, S.L.; HUBER, M.T.; HARRIS, D.A. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma-cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p. 15922-15928, 1993

SHYNG, S.L.; HEUSER, J.E.; HARRIS, D.A. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. **Journal of Cell Biology**, v. 125, p. 1239-1250, 1994.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behaviour. **Annu. Rev. Cel. Dev. Biol.**, v.17, p. 463-516, 2001.

STETLER-STEVENSON, W.G. Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases in Cell Signalling. **Sci Signal**, v. 1(27), 2008.

STÖCKER, W. *et al.* The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralytins and matrixins (collagenases) define a super-family of zinc peptidases. **Protein Sci.**, v. 4, p. 823-40, 1995.

STRONGIN, A. Y. *et al.* Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 5331-5338, 1995.

SUN, Y. *et al.* Oroxylin A suppresses invasion through down-regulating the expression of matrix metalloproteinase-2/9 in MDA-MB-435 human breast cancer cells. **European Journal Pharmacology**, v.603 (1-3), p.22-8, 2008.

SUNYACH, C. *et al.* The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 3591-3601, 2003.

SZKLARCZYK, A. Matrix Metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 22(3), p. 920-930, 2002.

TARABOULOS, A. *et al.* Targeting Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, p. 121-132, 1995.

TAYLOR, D.V. *et al.* Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clatrin-dependent endocytosis. **Journal of Cell Science**, v. 118 (21), p. 5141-5153, 2005.

TAYLOR, D.R.; HOOPER, N.M. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. **The Biochemical Journal**, v. 402, p. 17-23, 2007.

UHM, J. *et al.* Oligodendrocytes Utilize a Matrix Metalloproteinase, MMP-9, to Extend Processes Along an Astrocyte Extracellular Matrix. **Glia**, v. 22, p. 53-63, 1998.

URIA, J.A. *et al.* Differential effects of transforming growth factor- β on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 9769-77, 1998.

VAILLANT, C. *et al.* Spatiotemporal Expression Patterns of Metalloproteinases and Their Inhibitors in the Postnatal Developing Rat Cerebellum. **The Journal of Neuroscience**, v. 19 (12), p. 4994-5004, 1999.

VEY, M. *et al.* Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **PNAS**, v. 93, p. 14945-14949, 1996.

VINCENT, B. *et al.* Phorbol ester-regulated cleavage of in normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n°45, p. 35612-6, 2000.

VINCENT, B. *et al.* The desintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p. 37743-37746, 2001.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function and Biochemistry. **Cardiovascular Research**, p. 827-839, 2003.

VU, T. H. Don't mess with the Matrix. **Nature**, v.28, p.202-203, 2001.

WALMSLEY, A.R. *et al.* α -cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 40, p. 242-248, 2008.

WANG, H. *et al.* Endothelin-1 enhances cell migration via matrix metalloproteinase-9 up regulation in brain astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, p. 1133-1149, 2010.

WATT, N.T.; HOOPER, N.M. Reactive oxygen species (ROS)-mediated beta-cleavage of the prion protein in the mechanism of cellular response to oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 1123-1125, 2005.

WEEKS, B.S. *et al.* Laminin-1 and the RKRLQVQLSIRT Laminin-1 α 1 globular domain peptide stimulate matrix metalloproteinase secretion by PC12 cells. **Experimental Cell Research**, v. 243, p. 375-382, 1998.

WINDSOR, L.J. *et al.* Cell-type specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 17341-47, 1993.

WOESSNER, J.F.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. **Oxford University Press**, 2000.

WRIGHT, J.W. *et al.* Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases. **Brain Research**, v. 963, p. 252-261, 2003.

WRIGHT, J.W.; BROWN, T.E.; HARDING, J.W. Inhibition of hippocampal matrix metalloproteinase-3 and -9 disrupts spatial memory. **Neural Plasticity**, p.1-8, 2005.

WURM, S.; WECHSELBERGER, C. Prion protein modifies TGF- β induced signal transduction. **BBRC**, v. 349, p. 525-532, 2006.

YANG, Z.; STRICKLAND, D.K.; BORNSTEIN, P. Extracellular MMP2 levels are regulated by the low-density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin-2. **J.Bio. Chem.**, v. 276, p. 8403-09, 2001.

YONG, W. V. *et al.* Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. **Trends Neuroscience**, v. 21, n.2, p. 75-80, 1998.

YURCHENCO, P.D.; AMENTA, P.S.; PATTON B.L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biology**, v. 22, p. 521-538, 2004.

ZANATA, S.M. *et al.* Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **The EMBO Journal**, v.21, p. 3317-3326, 2002.

ZHAO, W. *et al.*, Migration and Metaloproteinases determine the invasive potencial of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Letters**, v. 162, p. 49-55, 2001.