

THIAGO JACOMASSO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE *MMPs* E DE SEUS INIBIDORES, *TIMPs* E *RECK*, EM LINHAGENS REPRESENTATIVAS DOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA HUMANO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer.

Co-orientadora: Profa. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri

CURITIBA

2010

AGRADECIMENTOS

A professora Sheila Winnischofer, pela orientação, conselhos, paciência e pela amizade.

A professora Eva Carnieri, pela acolhida no laboratório, conselhos, confiança e amizade.

Ao grupo da professora Mari Sogayar, pelo apoio ao nosso projeto, e em especial a Marina, pelo entusiasmo contagiante, pelo apoio, prestatividade e pela amizade.

Ao Núcleo de Fixação do Nitrogênio, pela disponibilização do equipamento de PCR em tempo real e pelo apoio técnico durante seu uso.

As professoras do laboratório de Oxidações biológicas.

Aos colegas de laboratório, principalmente ao Gustavo, a Juliana e a Monica, pelo companheirismo e amizade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro

TERMO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE *MMPs* E DE SEUS INIBIDORES, *TIMPs* E *RECK*, EM LINHAGENS REPRESENTATIVAS DOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA HUMANO

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca Examinadora:

Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Profa. Dra. Adriana Mercadante
Departamento de Patologia Básica – UFPR

Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Profa. Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 19 de Fevereiro de 2010

RESUMO

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele devido à sua tendência a sofrer metástase, tornando-se mais resistente à grande parte dos tratamentos e levando a um pior prognóstico para os pacientes. Algumas das alterações mais comuns encontradas em melanomas afetam a via Ras/Raf/MEK/ERK, que está envolvida na regulação da expressão de diversos genes supressores de tumor. Um destes genes, chamado *RECK* (*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*), codifica um inibidor de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) que é ancorado à membrana citoplasmática. Neste estudo foram quantificados os níveis do transcrito do gene *RECK* na sua forma canônica e nas recém-identificadas formas resultantes de *splicing* alternativo (isoformas B, D e I), utilizando a técnica de qRT-PCR, pela primeira vez em linhagens derivadas de lesões de melanoma de crescimento radial (RGP), de crescimento vertical (VGP) e metastático. Também foram quantificados os níveis dos mRNAs de *TIMP1*, *TIMP2*, *MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP*, os níveis da proteína RECK e as atividades de MMP-2 e MMP-9. Foi observada uma razão Isoforma B/transcrito canônico de *RECK* maior no grupo de linhagens metastáticas que no grupo de linhagens RGP+VGP ($p=0,0367$). Também foi verificado que o transcrito canônico do gene *RECK* é menos expresso na linhagem metastática WM1617 do que na linhagem derivada de seu tumor primário (WM278) ($p=0,0320$), enquanto *TIMP2* ($p=0,0456$) e *MT1MMP* ($p=0,0013$) são mais expressos na linhagem metastática. Neste mesmo caso a razão Isoforma B/transcrito canônico de *RECK* também é maior na linhagem metastática ($p=0,0432$). Já na linhagem 1205Lu os níveis da forma canônica do transcrito de *RECK* são significativamente maiores que na linhagem WM793, que lhe deu origem ($p=0,0089$), enquanto *TIMP2* ($p=0,0468$) e *MT1MMP* ($p=0,0011$) são menos expressos na linhagem metastática. Estes dados sugerem a possibilidade de que o produto proteico codificado pela isoforma B do transcrito de *RECK* possa possuir um papel oposto ao do produto canônico na progressão tumoral.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer due to its strong tendency to metastasize, becoming resistant to most available therapies, and leading to poor prognosis for the patients. Some of the common transformations displayed by melanomas affect the Ras/Raf/MEK/ERK pathway, which is involved in regulation of the expression of several tumor-suppressor genes. One of these genes, namely *RECK*, encodes a membrane-bound matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor. Here, both the canonical and the novel alternatively spliced *RECK* transcripts (isoforms B, D and I) were quantified, using the qRT-PCR technique, for the first time in melanoma cell lines derived from radial growth phase (RGP), vertical growth phase (VGP) and metastatic phase. The mRNA levels for *TIMP1*, *TIMP2*, *MMP2*, *MMP9* and *MT1MMP*, the RECK protein levels and the activities of MMP-2 and MMP-9 were also quantified. A significant increase of the B isoform/canonical *RECK* transcript ratio in metastatic cell lines was found, when compared to the RGP+VGP group ($p=0.0367$). It was verified that the canonical *RECK* transcript was downregulated in the metastatic WM1617 cell line when compared to its primary tumor-derived cell line (WM278), with concomitant high levels of *TIMP2* and *MT1MMP* in the metastatic cell line. In this case, the B Isoform/canonical *RECK* transcript ratio was also higher in the WM1617 cells ($p=0.0432$). Conversely, in the metastatic 1205Lu cell line was observed higher canonical RECK transcript levels than in its primary tumor-derived WM793 cell line, with lower levels of *TIMP2* ($p=0.0468$) and *MT1MMP* ($p=0.0011$) transcripts on the metastatic cell line. Taken together, these data suggest that, in contrast with the canonical *RECK*, the B isoform may have a tumor and metastasis promoting role in melanoma progression.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENÉTICAS DAS LINHAGENS DE MELANOMA UTILIZADAS.....	38
TABELA 2	- SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE qRT-PCR.....	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- ETAPAS DA PROGRESSÃO DO MELANOMA DE ACORDO COM O MODELO DE CLARK.....	16
FIGURA 2	- VIAS DE SINALIZAÇÃO FREQUENTEMENTE DESREGULADAS EM MELANOMAS.....	17
FIGURA 3	- REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	22
FIGURA 4	- ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA GLICOPROTEÍNA RECK.....	27
FIGURA 5	- MECANISMOS DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPs MEDIADA POR RECK.....	29
FIGURA 6	- VIAS ATUALMENTE DESCRITAS PARA A REGULAÇÃO DE RECK.....	32
FIGURA 7	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE <i>RECK</i>	33
FIGURA 8	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTEICOS CODIFICADOS PELAS ISOFORMAS ALTERNATIVAS DO TRANSCRITO DE <i>RECK</i>	34
FIGURA 9	- NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS CANÔNICO (ISOFORMA A) E ALTERNATIVOS DE RECK EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO.....	43
FIGURA 10	- MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE <i>RECK</i> DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA.....	45
FIGURA 11	- ABUNDÂNCIA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS EM RELAÇÃO À DO TRANSCRITO CANÔNICO DO GENE <i>RECK</i> EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO.....	47
FIGURA 12	- ALTERAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE <i>RECK</i> EM RELAÇÃO À SUA FORMA CANÔNICA DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA.....	48
FIGURA 13	- NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DE <i>TIMP1</i>	

	E <i>TIMP2</i> EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO.....	50
FIGURA 14	- MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>TIMP1</i> E <i>TIMP2</i> DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA...	51
FIGURA 15	- NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> E DE <i>MT1MMP</i> EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO.....	52
FIGURA 16	- MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> E <i>MT1MMP</i> DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA.....	53
FIGURA 17	- MODULAÇÃO DA RAZÃO ENTRE OS DIFERENTES TRANSCRITOS DE INIBIDORES DE MMPs E DOS DIFERENTES TRANSCRITOS DE MMPs EM CÉLULAS DE MELANOMA QUE REPRESENTAM FASES DISTINTAS DA PROGRESSÃO MALIGNA.....	54
FIGURA 18	- DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECK NOS EXTRATOS DE PROTEÍNA TOTAL DE LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO.....	56
FIGURA 19	- ZIMOGRAMA EM GELATINA DE LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA (SEM SEPARAÇÃO DE PRÓ-FORMAS).....	57
FIGURA 20	- ZIMOGRAMA EM GELATINA DE LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA...	58

LISTA DE SIGLAS

AINE	- Anti-inflamatório não-esteroidal
ANOVA	- Análise de variância
BLAST	- <i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	- Albumina sérica bovina
CDK	- Quinase dependente de ciclinas
cDNA	- DNA complementar
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DRM	- Membranas resistentes a detergentes
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EFC	- Eficiência na formação de colônias em ágar
EGF	- Fator de crescimento epidermal
ERK	- <i>External signal-regulated kinase</i>
FAK	- <i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	- Soro fetal bovino
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	- Proteína fluorescente verde
GPI	- Glicosilfosfatidilinositol
HDAc	- Histona deacetilases
HMBS	- Hidroximetilbilano sintase
HPRT	- Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
MEC	- Matriz extracelular
MEK	- <i>Mitogen-stimulated external signal-regulated kinase kinase</i>
MMP	- Metaloproteinase de matriz
mRNA	- RNA mensageiro
MT-MMP	- Metaloproteinase do tipo ligado à membrana
PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PI(3)K	- Fosfoinositídeo-3 quinase
PMSF	- Fluoreto de Fenilmetanosulfonila
PTEN	- <i>Phosphatase and tensin homologue</i>
qRT-PCR	- PCR quantitativo em tempo real
RECK	- <i>Reversion-inducing, cysteine rich protein with Kazal motifs</i>

RGP	- Fase de crescimento radial
RTK	- Receptor do tipo tirosina quinase
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
SPI	- Inibidor de serina protease
TIMP	- Inibidor tecidual de metaloproteinases
TSA	- Tricostatina A
VGP	- Fase de crescimento vertical
WT	- Tipo selvagem
α -MSH	- Hormônio de estimulação dos melanócitos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 MELANOMA	14
2.1.1 Patogênese	14
2.1.2 Tratamento	18
2.2 Matriz Extracelular e Metaloproteinases	20
2.2.1 MMPs e Melanoma	24
2.3 RECK	26
2.3.1 Estrutura e Localização Celular de RECK.....	26
2.3.2 Funções Conhecidas.....	28
2.3.3 Regulação da Expressão e da Atividade de <i>RECK</i>	30
2.3.4 Transcritos Alternativos de <i>RECK</i> Resultantes de Eventos de <i>Splicing</i> Alternativo.....	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA	37
5.2 EXTRAÇÃO DO RNA E SÍNTESE DO cDNA	38
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	39
5.3.1 <i>Primers</i> Utilizados	39
5.4 ZIMOGRAFIA	40
5.5 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS E ENSAIO DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	41
5.5.1 Antisoros	41
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS CANÔNICO E ALTERNATIVOS DO GENE <i>RECK</i> EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE REPRESENTAM DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA	43
6.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>TIMP1</i> E <i>TIMP2</i> EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE REPRESENTAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA	49
6.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> E DE <i>MT1MMP</i> EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE REPRESENTAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA.....	51
6.4 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DA FORMA CANÔNICA DE <i>RECK</i> EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA	55
6.5 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPs EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA	56
7 DISCUSSÃO FINAL	60
8 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é o tumor maligno derivado do melanócito (revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). Este tipo de tumor é de ocorrência mais rara dentre os cânceres de pele, respondendo por aproximadamente 4% destes, porém é o tipo que mais provoca mortes (AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS), 2009). Além disso, é o tipo de câncer mais comum em indivíduos jovens (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA), 2009). O Instituto Nacional do Câncer estima que em 2010 haja no Brasil pelo menos 2.960 casos de melanoma em homens e 2.970 em mulheres, sendo estes mais prevalentes na região Sul (INCA, 2009).

O modelo de Clark divide a progressão do melanoma em fases de acordo com as características histológicas das lesões, desde as fases benignas (*nevus* benigno e *nevus* displásico) até as malignas (fases de crescimento radial, RGP; vertical, VGP e; fase metastática) (CLARK *et al.*, 1984; revisado por MILLER e MIHM, 2006). Os eventos biológicos que causam o surgimento e a progressão do melanoma envolvem, entre outros aspectos, mutações em genes que regulam a proliferação celular e a interação das células com a matriz extracelular (MEC). A progressão pelas fases do modelo de Clark envolve o ganho de capacidade de degradar os componentes da MEC e de atravessar a membrana basal, eventos estes que estão relacionados à atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs).

Estas MMPs compõem uma família que, como um conjunto, é capaz de degradar a maioria dos componentes da MEC, como colágeno tipo IV e fibronectina (NAGASE e WOESSNER, 1999). A atividade proteolítica de MMPs em tecidos saudáveis é regulada de forma que haja apenas a degradação necessária para que ocorram os processos fisiológicos. Essa regulação é exercida por algumas moléculas presentes no espaço intercelular como as TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*), que são inibidores solúveis mais conhecidos e caracterizados de MMPs, e RECK (*Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*), um inibidor de MMPs que é ancorado à membrana. Este balanço proteolítico frequentemente encontra-se perturbado em estados patológicos como o câncer. Em melanomas, os níveis de MMPs na forma ativa encontram-se mais elevados nos tumores com maior capacidade de invasão (HOFMANN *et al.*, 1999), de forma que é

possível estabelecer uma correlação entre o prognóstico dos pacientes e a atividade proteolítica destas enzimas.

RECK é uma glicoproteína extracelular, ligada a membrana por uma âncora de GPI, que foi descoberta por sua capacidade de provocar a reversão do fenótipo tumoral em fibroblastos murinos transformados pelo oncogene *v-Ki-ras* (TAKAHASHI *et al.*, 1998). A atividade de supressor de tumor apresentada por RECK está relacionada, entre outras coisas, à inibição de MMPs, especificamente MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, que são amplamente descritas como envolvidas no processo de invasão tecidual por células tumorais. Essa inibição ocorre por diversos mecanismos, como inibição da transcrição, interrupção da maturação das pró-formas de MMPs e interação física com as enzimas (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001; TAKAGI *et al.*, 2009).

É grande o número de estudos que demonstram correlações entre os melhores prognósticos dos pacientes e a maior expressão de RECK em diferentes tipos de tumores (revisado por NODA e TAKAHASHI, 2007).

Até o momento não há dados publicados sobre o papel de RECK em melanomas, assim como dados sobre as funções de suas isoformas resultantes de *splicing* alternativo. Sabe-se, porém, que MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9, que são reguladas por RECK, têm participação na progressão dos melanomas (HOFFMAN *et al.*, 2000b). Sendo assim, o estudo da modulação da expressão do gene *RECK* e dos seus transcritos originados de *splicing* alternativo contribui para um melhor entendimento dos eventos moleculares que ocorrem durante a progressão do melanoma, e pode revelar, futuramente, alvos para novas drogas que possam ser utilizadas no seu tratamento.

Portanto, este trabalho visa a caracterização da expressão dos transcritos canônico e alternativos do gene *RECK* em linhagens de células de melanoma humano que representam os diferentes graus de progressão maligna do modelo de Clark – RGP, VGP e fase metastática, avaliando também a expressão dos genes *MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP*, *TIMP1* e *TIMP2* com o objetivo de verificar a existência de correlação entre os níveis destes transcritos e o grau de progressão das linhagens tumorais, através da quantificação do mRNA transcrito, utilizando reações de qRT-PCR. Também foi quantificado o produto proteico codificado pelo transcrito canônico de *RECK* através de ensaios de *Western Blotting*, e a atividade de MMPs, por zimografia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia maligna derivada do melanócito, a célula produtora do pigmento melanina, que se encontra presente na epiderme, nos olhos e nos intestinos (revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007).

Dentre os fatores que podem levar ao desenvolvimento do melanoma estão a predisposição genética, a cor da pele e o comportamento com relação à exposição à radiação ultravioleta (ACS, 2009). Uma quantidade muito grande de *nevi* (pintas escuras) está correlacionada com um maior risco de desenvolver melanoma (ACS, 2009).

De acordo com o relatório de estimativas do Instituto Nacional do Câncer o câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no Brasil entre os homens, e o segundo entre as mulheres. Estima-se que em 2010 serão diagnosticados 53.410 novos casos entre homens e 60.440 entre as mulheres (INCA, 2009). Dentre os cânceres de pele, os melanomas são os menos prevalentes: estima-se que haverá 2.960 e 2.970 novos diagnósticos em homens e em mulheres, respectivamente. Isso responde por 5,2% de todos os cânceres de pele. A principal área de incidência é a região Sul (INCA, 2009). Nos Estados Unidos eram esperados para 2008 34.950 novos diagnósticos de melanoma entre homens e 27.530 entre mulheres, e que 8.420 mortes ocorreriam devido à doença (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2009).

Apesar de ser o tipo mais raro de câncer de pele, o melanoma é o que mais provoca mortes devido à sua elevada tendência a sofrer metástases (ACS, 2009). A rapidez com que os melanomas progridem até a metástase pode ser explicada com base na característica migratória dos melanócitos que os originam (ALBERTS *et al.*, 2008).

2.1.1 Patogênese

O modelo de Clark divide as fases de progressão do melanoma com base nas suas alterações histológicas características (CLARK *et al.*, 1984; revisado por MILLER & MIHM, 2006). De acordo com este modelo, o primeiro evento do desenvolvimento do melanoma é a proliferação dos melanócitos normais, que

formam os *nevi* (pintas), e estabelecem lesões benignas, com os melanócitos crescendo uniformemente e de forma limitada ao longo da membrana basal. O segundo estágio do modelo é a displasia, que pode ocorrer tanto a partir de um *nevus* benigno quanto a partir de uma célula normal. Esta fase se caracteriza pelo crescimento aberrante dos melanócitos (CLARK *et al.*, 1984; revisado por MILLER & MIHM, 2006; revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). Estas lesões tomam a forma das pintas assimétricas e de coloração irregular que servem como marcadores clínicos para o diagnóstico, e histologicamente apresentam alterações morfológicas isoladas. A fase de crescimento radial (RGP) inicia-se quando as células displásicas ganham a capacidade de proliferar por toda a epiderme, e não somente ao longo da lâmina basal. As alterações morfológicas no tecido deixam de ser distribuídas de forma aleatória e passam a ser contínuas por toda a lesão (revisado por MILLER & MIHM, 2006). A partir desta fase, passa a haver uma diferenciação reduzida dos melanócitos. A fase de crescimento vertical (VGP) é a fase na qual as células tumorais adquirem a capacidade de penetrar a membrana basal, atingindo a derme. Por fim, a metástase é a fase do modelo de Clark onde as células se desprendem do tumor original, e são capazes de crescer em tecidos mais profundos da pele, atingir a corrente sanguínea, e colonizar outros órgãos como cérebro, pulmões ou fígado (CLARK *et al.*, 1984; MILLER e MIHM, 2006). A figura 1 mostra, de forma esquematizada, as alterações histológicas decorrentes da progressão do melanoma pelas fases do modelo de Clark.

Os eventos biológicos associados com cada fase do modelo de Clark envolvem diversas alterações moleculares, como por exemplo em fatores que regulam o crescimento celular ou que medeiam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular (HAASS *et al.*, 2005). Tais alterações, em geral, ocorrem devido a danos no genoma da célula, que podem ser causados, por agentes mutagênicos ou pela exposição à radiação, que afeta melanócitos e queratinócitos (GILCHREST *et al.*, 1999). Os genes alterados podem ser passados de geração em geração, o que configura o melanoma familiar (revisado por MILLER e MIHM, 2006).

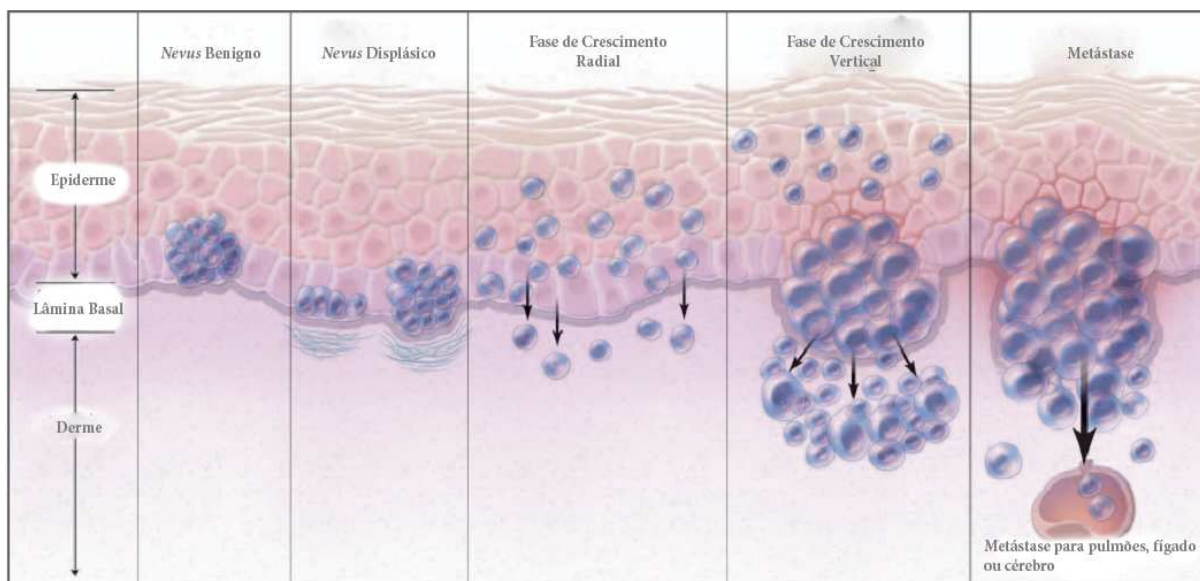


FIGURA 1 – ETAPAS DA PROGRESSÃO DO MELANOMA DE ACORDO COM O MODELO DE CLARK

FONTE: Miller e Mihm (2006).

NOTA: De acordo com o modelo proposto por Clark *et al.* (1984), os estágios da progressão do melanoma são divididos de acordo com as características histológicas da lesão. A fase menos agressiva seria aquela onde há uma hiperplasia dos melanócitos (*nevus benigno*). A lesão pode assumir características que causam perda da homeostase no tecido onde se encontra (*nevus displásico*). Na fase de crescimento radial (RGP) já há capacidade de ultrapassar a membrana basal, mas a proliferação continua sendo confinada às imediações dessa, diferentemente do que ocorre na fase de crescimento vertical (VGP). A última fase do modelo é a metástase, que é quando as células tumorais se desprendem do tumor original e colonizam tecidos distantes.

Durante as fases iniciais da progressão do melanoma ocorrem mutações em genes que causam ativação anormal de reguladores do ciclo celular como *N-ras* e *BRAF*. 62% dos casos de melanoma apresentam a mutação que troca o resíduo de Glu⁶⁰⁰ do gene *BRAF* por um resíduo de valina (DAVIES *et al.*, 2002). Esta mutação V600E provoca a ativação constitutiva da quinase B-Raf, que fosforila as quinases seguintes na via Ras/Raf/MEK/ERK (representada na figura 2), provocando assim a perda do controle do ciclo celular (DAVIES *et al.*, 2002; TSAO *et al.*, 2004). Já as mutações no gene *NRAS* estão presentes em cerca de 15% dos melanomas (DAHL e GULDBERG, 2007)

As alterações da segunda fase deste modelo geralmente afetam os mecanismos de reparo do DNA e a regulação do processo de apoptose (revisado por CROWSON *et al.*, 2007). Nesta etapa, ainda é possível que ocorra a reversão da tumorigênese. A continuação da progressão ou a regressão depende da presença ou da ausência de alterações em genes capazes de impedir a proliferação de células que possuem o seu genoma alterado. Exemplos destes genes são

CDKN2A e *PTEN*, supressores de tumor que promovem a parada do ciclo celular e estimulam a apoptose, através das vias de sinalização esquematizadas na figura 2 (revisado por MILLER e MIHM, 2006). O *CDKN2A* é um gene que codifica para dois supressores de tumor distintos. Um deles, $p16^{INK4A}$, é um inibidor de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), e o outro, $p14^{ARF}$, promove a apoptose após a ocorrência de danos ao DNA. Já o *PTEN* é um gene que codifica para uma fosfatase que atenua a sinalização desencadeada por fatores de crescimento que utilizam fosfatidilinositol fosfato como segundo-mensageiro (FLORES *et al.*, 1996).

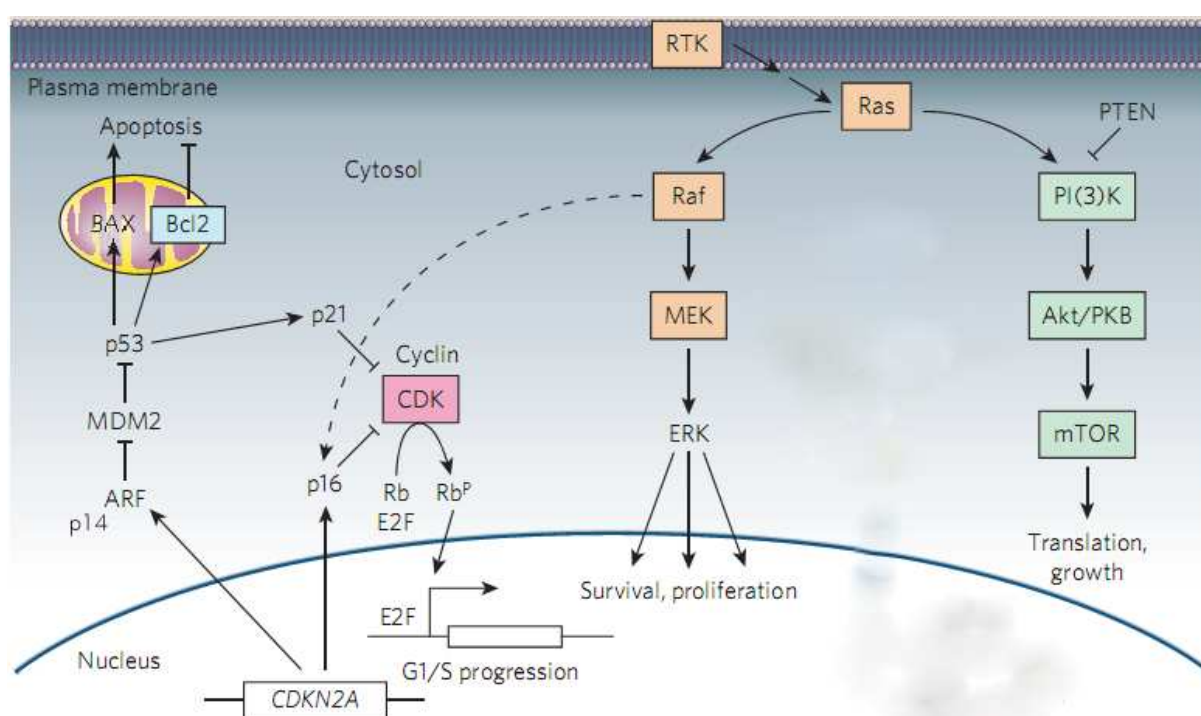


FIGURA 2 – VIAS DE SINALIZAÇÃO FREQUENTEMENTE DESREGULADAS EM MELANOMAS

FONTE: adaptado de Gray-Schopfer, Wellbrock e Marais (2007)

NOTA: Interações entre as principais vias de sinalização envolvidas no surgimento e progressão do melanoma. O receptor tipo tirosina quinase (RTK) transmite o sinal extracelular para Ras, que na sua forma ligada por GTP ativa as vias Raf/MEK/ERK ou PI(3)K/Akt/mTOR; MDM2, (*mouse double minute protein 2*) liga a p53 e o conduz para a ubiquitinação e destruição no proteossomo.

A característica invasiva adquirida na fase de crescimento vertical se deve, em parte, à distúrbios em moléculas de adesão (como as caderinas) e em receptores de matriz extracelular (integrinas). A expressão preferencial da integrina $\alpha_v\beta_3$, em relação a outras integrinas expressas por tumores menos agressivos e melanócitos saudáveis, e a diminuição da expressão de E-caderina (com aumento da expressão de N-caderina) são marcadores da passagem da fase de crescimento

radial para a de crescimento vertical (DANEN *et al.*, 1994; HSU *et al.*, 2000). Efeitos da integrina $\alpha\beta_3$ descritos em melanoma incluem o aumento da expressão de enzimas que degradam a matriz extracelular (BROOKS *et al.*, 1996) e o estímulo da expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, quando da interação da integrina com seus ligantes na MEC (PETITCLERC *et al.*, 1999).

A metástase é a última fase do modelo. O conjunto de eventos moleculares que ocorrem nas etapas iniciais da progressão habilita a célula a invadir e sobreviver longe do sítio do tumor original. Esta capacidade de sobrevivência resulta, em parte, da perda da dependência de fatores de crescimento, como por exemplo o α -MSH (que estão presentes exclusivamente na epiderme), para a ativação do ciclo celular. Ao longo da progressão maligna alterações nas vias regulatórias do ciclo provocam a sua ativação constitutiva, de forma que as células tumorais são capazes de proliferar mesmo em tecidos nos quais não há síntese destes fatores de crescimento (revisado por MILLER e MIHM, 2006).

Ao atingir a corrente sanguínea, as células com capacidade metastática instalam-se em órgãos como pulmões, fígado e linfonodos (CLARK *et al.*, 1984). O desenvolvimento de metástases piora drasticamente o prognóstico, já que os tumores secundários formados tendem a ser mais resistentes às terapias atualmente empregadas, enquanto melanomas nas fases iniciais da progressão podem ser facilmente removidos em pequenas intervenções cirúrgicas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

2.1.2 Tratamento

O sucesso no tratamento do melanoma depende muito de um diagnóstico precoce. Em casos onde a doença está menos avançada a cirurgia para remoção da massa tumoral, juntamente com uma parte do tecido circundante, já é o suficiente para a eliminação do melanoma. Esta é a abordagem adotada em 80% dos casos (revisado por MILLER e MIHM, 2006). A abordagem farmacológica padrão para o tratamento de melanomas primários é o tratamento com dacarbazina, carboplatina e paclitaxel, drogas utilizadas como complemento à remoção cirúrgica (TARHINI e AGARWALA, 2006; revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007, RUSSO *et al.*, 2009). Em outros casos, onde os linfonodos já foram invadidos, ou onde houve metástase para órgãos mais distantes, os tratamentos podem incluir

citocinas como a interleucina-2 e interferon- α , ambos com eficácia duvidosa e com diversos efeitos adversos (TARHINI e AGARWALA, 2006; revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). Agentes quimioterápicos como a carmustina, o paclitaxel e a cisplatina são os fármacos de primeira escolha a ser utilizados como tratamento (TARHINI e AGARWALA, 2006; revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). Estes fármacos são efetivos em menos de 10% dos casos de melanoma metastático (TARHINI e AGARWALA, 2006). Além da quimioterapia, a radioterapia também pode ser empregada como complemento à intervenção cirúrgica (ACS, 2009). As consequências da quimioterapia e da radioterapia para os pacientes são notórias: queda dos pêlos, deficiência imunológica, etc. Devido a estas limitações quanto à eficácia e efeitos colaterais, novas alternativas de tratamentos ou maneiras de entregar as drogas de forma mais específica aos seus alvos têm sido pesquisados.

O melhor conhecimento das vias de sinalização que se encontram desreguladas no melanoma tem permitido o desenvolvimento de novos fármacos e esquemas terapêuticos que auxiliam no seu tratamento. Estes novos tratamentos visam à interrupção de cascatas regulatórias que estão excessivamente ativadas em células tumorais, como por exemplo a cascata da via Ras/Raf/MEK/ERK (revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007; TSAI *et al.*, 2008; RUSSO *et al.*, 2009). Quinases, proteases e fosfatases destas vias de sinalização estão entre os alvos mais promissores para serem modulados por novas moléculas capazes de interagir com os seus sítios catalíticos de forma específica. Fármacos que possuem especificidade para B-Raf^{V600E} foram desenvolvidos recentemente, e sua citotoxicidade foi comprovada como ocorrendo apenas em linhagens de melanoma que possuem este alelo mutado (TSAI *et al.*, 2008).

Fármacos que inibem a sinalização de Ras também são promissores no tratamento de melanomas. Exemplos destes fármacos são as moléculas que inibem a Ras-farnesil transferase. Esta enzima é responsável por uma modificação pós-traducional sem a qual Ras não possui atividade. O tratamento de linhagens de melanoma *in vitro* com estes inibidores as tornou mais sensíveis à cisplatina (SMALLEY *et al.*, 2003, RUSSO *et al.*, 2009).

Por fim, terapias que estimulem a apoptose das células tumorais já estão disponíveis para o tratamento de melanoma, como por exemplo oligonucleotídeos antisense contra Bcl-2 (POUST, 2008).

Todas estas novas abordagens farmacológicas são decorrentes da identificação de alvos moleculares relevantes para o surgimento e progressão do melanoma (revisado por GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). A identificação das alterações moleculares relacionadas ao melanoma é, portanto, de grande importância para o avanço na descoberta de tratamentos mais eficazes.

2.2 Matriz Extracelular e Metaloproteinases

O desenvolvimento e a progressão de tumores estão intimamente relacionados com a interação entre as células tumorais e o ambiente que as cerca. A matriz extracelular (MEC) é parte importante deste ambiente, pois além de servir de suporte serve também como um agente regulador do metabolismo da célula (EGEBLAD e WERB, 2002).

A composição da MEC varia de acordo com o tecido onde ocorre. Apesar de a proporção entre os componentes variar, a MEC é sempre formada pelos mesmos tipos de macromoléculas: proteínas, glicoproteínas e carboidratos. Estas moléculas associam-se entre si, conferindo propriedades físicas características a cada tecido, dependendo da composição relativa de cada tipo de macromoléculas. Estas características variam desde a resistência mecânica dos tendões até a elasticidade dos tecidos da pele (ALBERTS, 2008).

Além de determinar as propriedades físicas de tecidos e de servir como suporte para as células, a MEC ainda regula a difusão de moléculas sinalizadoras, facilitando ou impedindo que estes fatores cheguem aos respectivos receptores celulares, exercendo desta forma um efeito importante sobre o metabolismo da célula. Este efeito é desempenhado no tecido epitelial cutâneo pela lâmina basal, que separa a epiderme da derme. Esta lâmina é formada principalmente por colágeno tipo IV e lamininas, e serve como barreira para manter determinadas moléculas e células confinadas à epiderme (ALBERTS, 2008).

A interação das células com a matriz se dá através de moléculas de adesão célula-MEC, representadas principalmente pelas integrinas. Estas integrinas são heterodímeros associados à membrana plasmática que possuem domínios de ligação a componentes da MEC como colágenos, fibronectina e vitronectina (ALBERTS, 2008). Os melanócitos saudáveis crescem ao longo da lâmina basal, e

interagem com ela pela expressão de moléculas de adesão (integrinas) que se ligam especificamente aos seus componentes (HAASS *et al.*, 2005).

Tipos celulares que apresentam característica migratória, como os macrófagos, ou invasiva, como as células tumorais, deslocam o equilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC no sentido de degradar as moléculas que a compõem para permitir sua passagem. Neste equilíbrio, a síntese das moléculas constituintes da matriz é contrabalançada pela produção de enzimas capazes de degradá-las (NAGASE *et al.*, 2006). Durante a progressão do melanoma, as células tumorais adquirem a capacidade de invadir a lâmina basal e chegar à derme. A degradação da lâmina basal é mediada principalmente por metaloproteinases de matriz extracelular (IIDA *et al.*, 2004).

As metaloproteinases de matriz extracelular – *matrix metalloproteinases*, MMPs – também conhecidas como matrixinas – são uma família de proteases dependentes de zinco. Como um conjunto, essas proteases são capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular e proteínas de tecidos conectivos, e algumas são capazes de clivar moléculas que não fazem parte da matriz. Atualmente são conhecidos mais de vinte componentes desta família em humanos. Alguns membros desta classe de proteases possuem alguma seletividade quanto ao substrato, mas em geral, os espectros de ação das MMPs se sobrepõem (NAGASE *et al.*, 2006; DERYUGINA e QUIGLEY, 2006). As matrixinas, juntamente com as serralisinas, adamalisinas e as astracinas, compõem uma superfamília de proteases conhecida como metzincinas (STAMENKOVIC, 2003).

As MMPs podem ser solúveis ou possuir domínios transmembrana (*membrane-type* – MT-MMPs). Mesmo MMPs solúveis podem estar localizadas transitória ou permanentemente junto à membrana citoplasmática, através de interações com outras proteínas de membrana (NAGASE *et al.*, 2006).

De modo geral, MMPs são produzidas e secretadas como zimogênios. Estas contêm um peptídeo-sinal, que direciona a proteína recém traduzida para a secreção, e um pró-peptídeo, seguidos pelo domínio catalítico, onde se liga o Zn^{2+} (BODE *et al.*, 1999b; CHAKRABORTI *et al.*, 2003). Com exceção de duas MMPs – MMP-7 e MMP-26, que são conhecidas por MMPs de domínio mínimo – todas apresentam ainda um domínio semelhante à hemopexina que lhes conferem alguma especificidade quanto ao substrato (MURPHY e KNÄUPER, 1997), enquanto serve também como sítio de ligação de inibidores (CLARK *et al.*, 2008). Os pró-peptídeos

das MMPs possuem um resíduo de Cys que liga o íon Zn^{2+} catalítico, o que torna as enzimas inativas (SPRINGMAN *et al.*, 1990; BODE *et al.*, 1999b). A organização dos domínios de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP são representados na figura 3.

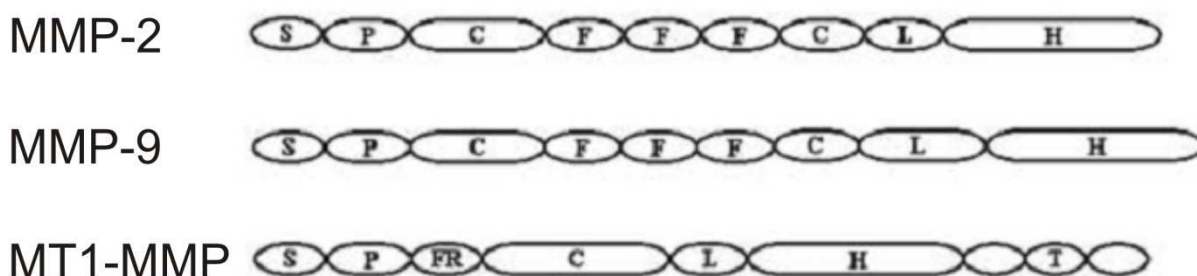


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ EXTRACELULAR

FONTE: Adaptado de Chakraborti *et al.* (2003)

NOTA: Os domínios de três metaloproteinases são representados de forma esquemática. As letras indicam o tipo ou função do domínio. S, sequência sinal; P, pró-peptídeo; C, domínio catalítico; F, domínios semelhantes à fibronectina; L, peptídeo de ligação; H, domínio semelhante a hemopexina; T, domínio transmembrana; FR, domínio de clivagem por furinas.

A clivagem do pró-peptídeo, que converte o zimogênio em MMP ativa, é catalisada por outras proteases. Em vários casos esta clivagem é catalisada por outras MMPs (NAGASE *et al.*, 2006). Na ativação da MMP-2, por exemplo, a primeira clivagem é mediada por um complexo formado por MT1-MMP – uma metaloproteinase ligada à membrana – e por TIMP-2 (Inibidor tecidual de metaloproteinase-2, que quando fora deste complexo atua inibindo MMPs). Este complexo desestabiliza a pré-pró-MMP-2 enquanto outra molécula de MT1-MMP cliva o peptídeo, formando a pró-MMP-2 (STRONGIN *et al.*, 1995; BUTLER *et al.*, 1998; STRONGIN *et al.*, 2001), que sofre, então, uma clivagem autoproteolítica que libera o peptídeo ativo (DERYUGINA *et al.*, 2001). MMP-2, por sua vez, é uma das proteases capazes de clivar o pró-peptídeo da pró-MMP-9 (CHAKRABORTI *et al.*, 2003).

A homeostase da MEC depende de diversos mecanismos de controle de expressão, atividade e localização, que permitem regulação estrita o local e o momento em que ocorrerá a degradação (BASBAUM e WERB, 1996; BREW, DINAKARPANDIAN e NAGASE, 2000). Quando esta regulação espaço-temporal da atividade proteolítica na MEC é perdida os tecidos têm a sua organização comprometida, o que promove o surgimento das características patológicas de

algumas doenças como artrite e câncer (BASBAUM e WERB, 1996; BREW, DINAKARPANDIAN e NAGASE, 2000). Células tumorais originadas de vários tecidos possuem atividade de MMPs aumentada, incluindo a MT1-MMP, MMP-2 e de MMP-9 (FINGLETON, 2006).

O controle da expressão gênica de MMPs é modulado em resposta à estímulos de citocinas e fatores de crescimento, que se ligam a receptores na superfície da célula, desencadeando cascatas de sinalização intracelulares que, por sua vez, ativam fatores de transcrição que se ligam à regiões responsivas presentes no promotor de seus genes alvos, incluindo o gene de diferentes MMPs. A região promotora desses genes apresenta sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição, de forma que para um determinado contexto celular existe certo conjunto de MMPs que são produzidas (CLARK *et al.*, 2008).

A localização precisa da proteólise da MEC é modulada pela associação das MMPs com proteínas de membrana, ou ainda pela mobilização de MT-MMPs para uma dada região da membrana onde haverá degradação da matriz no espaço pericelular (BASBAUM e WERB, 1996; NAGASE *et al.*, 2006; DERYUGINA e QUIGLEY, 2006). Um exemplo da importância da distribuição espacial de MMPs é a mobilização de MT1-MMP para estruturas celulares conhecidas como *invadopodia*, que são projeções da membrana citoplasmática que se inserem na matriz extracelular em processos invasivos. A presença da MT1-MMP aumenta a formação de MMP-2 nas proximidades destas estruturas, de forma que a capacidade proteolítica se torne maior nestas regiões (NAKAHARA *et al.*, 1997).

Já a extensão da degradação da MEC está diretamente relacionada com o balanço entre MMPs e seus inibidores. Os inibidores mais descritos para MMPs são as TIMPs, que atuam nos tecidos, e as α -macroglobulinas, presentes no soro (NAGASE *et al.*, 2006). Outro inibidor descrito mais recentemente, RECK, possui uma característica única dentre os inibidores de MMPs: é uma proteína ancorada à membrana citoplasmática, capaz de inibir especificamente MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (TAKAHASHI *et al.*, 1998, OH *et al.*, 2001). A perturbação deste equilíbrio entre enzimas proteolíticas e seus inibidores é um dos fatores que colaboram para a manifestação de características morfológicas do câncer e de outras doenças como artrite e algumas desordens neurológicas (BASBAUM e WERB, 1996; BREW, DINAKARPANDIAN e NAGASE, 2000).

TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) são um conjunto de proteínas homólogas que são capazes de inibir MMPs através da interação física, formando complexos TIMP-MMP que tornam a protease inativa (GOMEZ *et al.*, 1997). Atualmente se conhecem quatro TIMPs que apresentam algumas diferenças estruturais sutis entre si. As diferenças estruturais não prejudicam a capacidade inibitória sobre MMPs, mas acrescenta espectros de especificidade (BASBAUM e WERB, 1996; BREW, DINAKARPANDIAN e NAGASE, 2000). TIMP-1 inibe principalmente a MMP-9, enquanto TIMP-2 inibe preferencialmente a enzima MMP-2 (WARD *et al.*, 1991; GOMEZ *et al.*, 1997). As MT-MMPs são inibidas por TIMP-2 e TIMP-3 de forma mais eficiente que por TIMP-1. Contraditoriamente, TIMP-2 participa de um complexo ternário localizado na membrana plasmática da célula formado por MT1-MMP e proMMP-2, o qual promove a clivagem do pro-peptídeo de MMP-2 e a conversão deste em sua forma ativa (STRONGIN *et al.*, 1995; BUTLER *et al.*, 1998; STRONGIN *et al.*, 2001). Há indícios da interação sinérgica entre RECK e TIMPs, como relatado por Oh *et al.* (2006) que encontrou evidências de que, em células endoteliais vasculares, TIMP-2 reduz a atividade de MMPs através do aumento da expressão de RECK e TIMPs, além da inibição física da protease.

Além da atividade de inibidor de MMPs, as TIMPs possuem ainda outras funções independentes destas proteases, como promoção ou inibição do crescimento celular e promoção ou inibição da apoptose, através da sua ligação com receptores na superfície celular e ativação de cascatas de sinalização intracelular específicas (BASBAUM e WERB, 1996; BREW, DINAKARPANDIAN e NAGASE, 2000; STETLER-STEVENSON, 2008). Estas atividades contraditórias conferem às TIMPs um papel dual, que será ditado pelo contexto onde se encontra a célula.

2.2.1 MMPs e Melanoma

As enzimas MMPs estão comumente mais expressas em diversos tipos de câncer (revisado por BASBAUM e WERB, 1996; FINGLETON, 2006), incluindo o melanoma (HOFMANN *et al.*, 2005). A desestabilização da MEC provocada por estas proteases permite que a célula tumoral atravesse a membrana basal e atinja a derme, outros tecidos da pele e a corrente sanguínea. A passagem das células tumorais pela membrana basal é um evento importante na progressão do melanoma, pois esta membrana impede a passagem de fatores de crescimento e

hormônios, como por exemplo o α -MSH, hormônio que estimula os melanócitos a ativar o ciclo celular, e que é secretado pelos queratinócitos, para a derme (CROWSON *et al.*, 2007). A redução da organização da membrana basal e a passagem dos fatores de crescimento para a derme permitem que as células invasoras tenham seus ciclos ativados e proliferem nos tecidos mais profundos da pele. Além da degradação da membrana basal as MMPs, particularmente a MMP-9, estimulam a vascularização dos tumores (HESLING *et al.*, 2004).

Níveis altos de expressão de MT1-MMP e de MMP-2 apresentam-se correlacionadas com o aumento da capacidade de invasão de melanomas em amostras teciduais de pacientes, enquanto os níveis de MMP-9 encontram-se mais baixos em lesões metastáticas do que em lesões primárias (IIDA *et al.*, 2004; HOFMANN *et al.*, 2005). Em melanomas, as metaloproteinases de matriz possuem papel na degradação da lâmina basal, que separa a epiderme da derme, que é constituída de, entre outras moléculas, colágeno tipo IV, um dos substratos para estas MMPs (IIDA *et al.*, 2004).

Estudos *in vivo* demonstraram que a expressão da forma ativa de MMP-2 correlaciona-se positivamente com a capacidade metastática de linhagens de melanoma humano (MV3 e BLM), sugerindo que a maior expressão de MMP-2 colabora para a progressão do melanoma (HOFMANN *et al.*, 1999). A expressão do transcrito de *MMP-2* em linhagens de melanoma é estimulada pela sinalização da integrina $\alpha_v\beta_3$, que é mais expressa em melanomas mais agressivos (SEFTOR *et al.*, 1993; BROOKS *et al.*, 1996). Além de estimular a expressão de *MMP-2*, esta integrina associa-se à forma ativa da MMP-2, retendo-a na superfície da célula. Esta interação provoca ainda a redução da afinidade da integrina ao seu substrato, a vitronectina (um componente da matriz extracelular), e facilita a migração de tumores de crescimento vertical e metastáticos (BROOKS *et al.*, 1996). De forma semelhante, linhagens de melanoma que expressam MMP-9 constitutivamente apresentaram maior quantidade de metástases nos pulmões quando implantadas em camundongos imunodeficientes (MACDOUGALL *et al.*, 1995). Portanto, MMP-9 parece ser importante quando o tumor primário origina uma metástase, mas níveis altos não são necessários para a manutenção da lesão metastática (HOFFMAN *et al.*, 2005).

Estes dados demonstram a importância de MMPs e de seus reguladores no desenvolvimento das características morfológicas do melanoma.

2.3 RECK

O gene *RECK* foi descoberto a partir do *screening* de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano normal com o intuito de desvendar alvos moleculares capazes de induzir a reversão fenotípica da linhagem DT (células NIH-3T3 transformadas com o oncogene *v-Ki-ras*) (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

A capacidade de induzir reversão do fenótipo tumoral despertou o interesse no estudo das funções de RECK em tumores. De forma geral, esta proteína está presente em níveis altos na maioria dos tecidos adultos normais, enquanto encontra-se expressa em níveis mais baixos ou mesmo indetectáveis em alguns tipos de tumores (revisado por NODA e TAKAHASHI, 2007). Além disso, pacientes com tumores que apresentam expressão de RECK em níveis mais altos possuem melhor prognóstico. Tal fato foi observado em pacientes com hepatocarcinomas (FURUMOTO *et al.*, 2001), cânceres de mama (SPAN *et al.*, 2003), cânceres de pulmão (TAKENAKA *et al.*, 2005; TAKEMOTO *et al.*, 2007; LONG *et al.*, 2008; PESTA *et al.*, 2009), cânceres de intestino (TAKEUCHI *et al.*, 2004; VAN DER JAGT *et al.*, 2006; OSHIMA *et al.*, 2008), cânceres de próstata (OHL *et al.*, 2005), cânceres de estômago (SONG *et al.*, 2006) e osteosarcomas (KANG *et al.*, 2007).

2.3.1 Estrutura e Localização Celular de RECK

RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*) é uma glicoproteína de aproximadamente 110 kDa, rica em cisteína, que possui três domínios do tipo inibidor de serina protease, um dos quais apresentando a seqüência consenso denominada de motivo Kazal (LASKOWSKI e KATO, 1980). Além disso, possui ainda dois domínios com homologia parcial ao fator de crescimento epidermal (EGF) (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Estas características estão esquematizadas na figura 4.

A porção N-terminal de RECK possui quatro sítios onde ocorre glicosilação (SIMIZU *et al.*, 2005). Estes encontram-se próximos aos domínios ricos em cisteína.

Esta proteína encontra-se ligada à membrana citoplasmática por uma modificação glicosilfosfatidilinositol (GPI) em sua extremidade carboxiterminal (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

Recentemente, foi verificado, através de microscopia de fluorescência em células NIH3T3 que superexpressavam uma proteína de fusão RECK conjugado com GFP (*Green Fluorescent Protein*), que RECK está mais presente em regiões perinucleares da membrana (MORIOKA *et al.*, 2009). Berg *et al.* (2009) demonstraram, utilizando linhagens de sinoviócitos, que a proteína RECK localiza-se em regiões de caveolos (que são invaginações funcionais da membrana da célula), formadas por proteínas estruturais chamadas caveolinas.

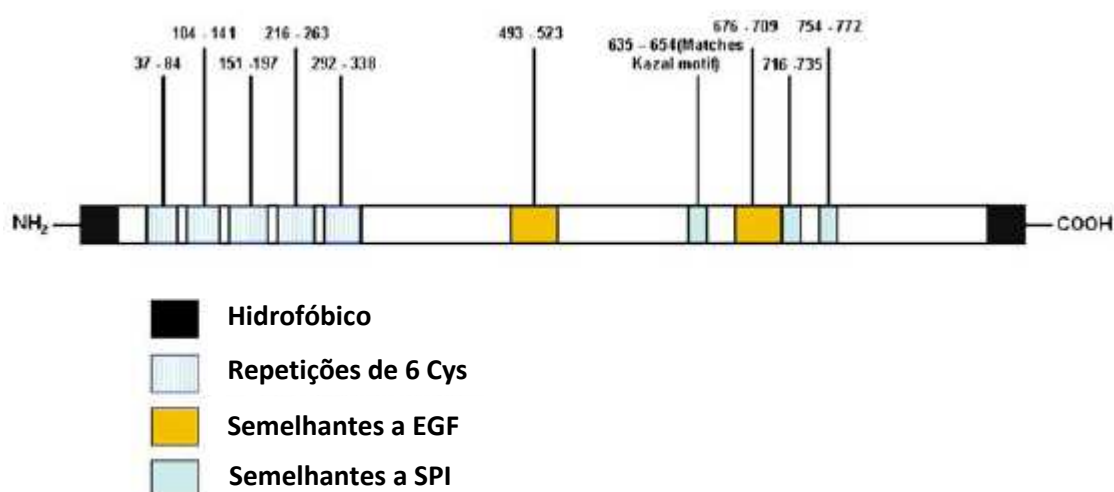


FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA GLICOPROTEÍNA RECK

FONTE: CLARK *et al.* (2007)

A análise da sequência de aminoácidos da proteína RECK mostra a presença de alguns motivos funcionais, sendo que a função de algumas delas ainda não é bem conhecida. Entre estes domínios estão as repetições de seis cisteínas (Cys), os domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) e os domínios semelhantes a inibidores de serina proteases (SPI), sendo que um destes possui homologia completa com o motivo Kazal. Os números acima mostram os resíduos de aminoácidos onde os domínios representados começam e terminam.

Omura *et al.* (2008) demonstrou, por meio de processamento computacional de imagens de microscopia de transmissão, que uma forma recombinante de RECK (na qual o sinal para ligação GPI da porção C-terminal foi substituída por resíduos de histidina) é capaz de formar dímeros e que estes possuem uma estrutura tridimensional semelhante a um sino, além de uma grande cavidade interna. Os autores verificaram ainda que a proteína intacta, quando desligada da membrana através de tratamento enzimático, também encontra-se na forma dimérica (Omura *et al.*, 2008).

2.3.2 Funções Conhecidas

Takahashi *et al.* (1998) propuseram inicialmente que RECK inibe a secreção da pró-MMP-9 e a atividade catalítica da mesma. Este dado foi confirmado em 2001 por Oh *et al.*, que também encontraram evidências da inibição de outras duas MMPs: redução dos níveis de MMP-2 por inibição do processamento proteolítico da pró-MMP-2 e; inibição da atividade catalítica da MT1-MMP (OH *et al.*, 2001; MIKI *et al.*, 2007).

RECK atua como um inibidor não competitivo da atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9, por meio de interações físicas (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001). A interação de RECK com MMP-9 no meio extracelular parece ser mediada pelos dois domínios semelhantes a inibidores de serina proteases, situados entre os resíduos de aminoácidos 676 e 799 (correspondentes ao segundo e ao terceiro motivo SPI da proteína completa) (CHANG, HUNG e CHANG, 2008). A glicosilação do resíduo de Asn²⁹⁷ é necessária para que RECK seja capaz de inibir a atividade de MMP-9, enquanto a inibição da ativação de MMP-2 requer a glicosilação do resíduo de Asn³⁵² (SIMIZU *et al.*, 2005).

Recentemente foi demonstrado que células de fibrossarcoma humano que superexpressam RECK possuem níveis mais baixos de mRNA de *MMP9* (TAKAGI *et al.*, 2009). A regulação exercida por RECK sobre a transcrição do gene *MMP9* envolve a diminuição da ligação dos fatores de transcrição Fra-1 e c-Jun à região promotora do gene *MMP9* (TAKAGI *et al.*, 2009). O mecanismo pelo qual RECK é capaz de modular a capacidade de ligação de fatores de transcrição presentes no núcleo ainda é alvo de especulações, e são necessários maiores estudos para que o mesmo seja elucidado.

A inibição de MT1-MMP mediada por RECK ocorre devido à interação física entre estas duas moléculas, provocando redução da atividade catalítica desta metaloproteinase. Tal interação foi verificada *in vitro*, em ensaios nos quais se utilizava formas solúveis de ambas as moléculas para verificar a proteólise exercida por esta MMP sobre um substrato fluorescente. Nestes testes verificou-se que o efeito inibitório exercido por RECK sobre MT1-MMP somava-se ao efeito inibitório de TIMP-2, que sabidamente inibe MT1-MMP devido à interação direta destas duas moléculas (OH *et al.*, 2001). A forma como estas proteínas interagem na superfície da célula foi investigada por Miki *et al.* (2007), que concluíram que RECK “recruta”

MT1-MMP (e outras moléculas) para regiões da membrana citoplasmática que são mais resistentes à detergentes (DRMs – *detergent resistant membranes*) devido à uma composição diferenciada de lipídios. Além disso, concluíram que a ação inibitória de RECK sobre a MT1-MMP depende da composição da região da membrana à qual RECK está ancorada. Por fim, demonstraram ainda que RECK altera a via pela qual a MT1-MMP é internalizada, o que torna a degradação desta metaloproteinase mais rápida.

RECK é ainda capaz de inibir a ação de MT1-MMP quando esta cliva o pró-peptídeo da pró-MMP-2. A inibição da atividade de MT1-MMP por RECK é um dos mecanismos pelos quais os níveis de MMP-2 funcionais são regulados (OH *et al.*, 2001).

RECK inibe ainda a clivagem de fibronectina catalisada por MMP-7. Estes resultados recentes permitem a sugestão de um provável sítio de ação de RECK sobre seus alvos, uma vez que MMP-7 é composta apenas pelo domínio catalítico das MMPs (OMURA *et al.*, 2008).

A figura 5 mostra os mecanismos moleculares, descritos até o momento, pelos quais RECK inibe a degradação da MEC mediada por inibição de MMPs.

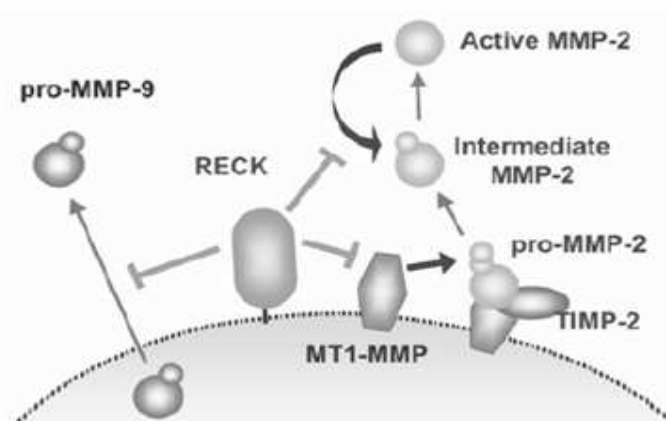


FIGURA 5 – MECANISMOS DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPs MEDIADA POR RECK
 FONTE: NODA, 2007

NOTA: RECK exerce suas funções através da inibição de MMPs em diversos níveis. Inicialmente foram encontradas evidências de que RECK inibe a ação de MMP-9 através da inibição da secreção de sua pro-forma (proMMP-9). Porém novos dados indicam que RECK regula a transcrição do gene desta MMP (não representado na figura). RECK também promove a diminuição da ativação da proMMP-2, inibindo a clivagem desta por MT1-MMP. Por fim, RECK impede a clivagem autoproteolítica de MMP-2. As setas negras indicam ativação, enquanto as barras indicam inibição.

Alguns efeitos biológicos causados pela inibição de MMPs exercida por RECK foram descritos. Oh *et al.* (2001) demonstraram que camundongos RECK^{-/-} morriam antes do nascimento, por volta da metade do 11º dia do período

embrionário. Este fenótipo foi parcialmente revertido em animais *RECK*^{-/-}/*MMP-2*^{-/-}, confirmando que MMP-2 é um alvo fisiológico de RECK. Neste estudo foi verificado também que os embriões que não expressavam RECK morriam com severa hemorragia abdominal, com sistema vascular imaturo e deficiência na formação do tubo neural. Morioka *et al.* (2009) conduziu um estudo no qual mostrou o efeito da expressão de RECK na estabilização de adesões focais, na manutenção da polaridade antero-posterior e na migração de fibroblastos murinos, efeitos estes também decorrentes da inibição exercida sobre MMPs.

2.3.3 Regulação da Expressão e da Atividade de *RECK*

O fato do gene *RECK* estar menos expresso em vários tipos de tumores em relação aos tecidos normais adjacentes sugeriu o envolvimento de oncogenes e oncoproteínas na sua regulação.

Foi verificado que *RECK* é inibido por diversos oncogenes, como *ras* (Takahashi *et al.* 1998). Para elucidar o mecanismo pelo qual Ras regula a expressão de *RECK*, Sasahara *et al.* (1999a) caracterizaram a porção da região promotora do gene *RECK* de camundongos que responde à sinalização mediada pela oncoproteína Ras. Tal elemento responsivo encontra-se entre os nucleotídeos -52 e +82 do promotor de *RECK*. Nesta porção do promotor existem duas regiões com sequências consenso para a ligação dos fatores de transcrição Sp1 e Sp3, sendo que uma destas duas regiões está localizada a montante do sítio de início da transcrição (denominada Sp1(A)), enquanto a outra encontra-se a jusante (Sp1(B)). Foi verificado que os fatores de transcrição Sp1 e Sp3 podem ligar-se à ambos os sítios, mas apenas a região Sp1(B) parece ser importante para a regulação por Ras (SASAHARA *et al.*, 1999a, 1999b e 2002).

Sob a sinalização de Ras, a quinase Raf torna-se ativa, fosforilando e ativando outra quinase, a MEK (*Mitogen-stimulated external signal-regulated kinase kinase*), que por sua vez ativa a ERK (*external signal-regulated kinase*). ERK então fosforila Sp1 nos resíduos de Thr⁴⁵³ e Thr⁷³⁹. Sp1 fosforilada liga-se ao elemento responsivo Sp1(B) na região promotora de *RECK* juntamente com histona-deacetilases (HDACs), para exercer a inibição da expressão de *RECK*. O tratamento com tricostatina A (TSA), um inibidor de HDAC impediu a inibição da transcrição de *RECK* por Ras (CHANG, LIU e HUNG., 2004). De fato, alguns inibidores de HDACs

são capazes de provocar reversão fenotípica tumoral-normal em células transformadas, sendo que um dos mecanismos sugeridos envolve a ativação da transcrição de *RECK* (LIU *et al.*, 2003). O oncogene *HER-2/neu* (*ErbB2*) também tem ERK como quinase efetora e é capaz de provocar a diminuição da transcrição de *RECK* (HSU, CHANG e HUNG, 2006).

Evidências apontam que o controle transcricional de *RECK* ocorre também pela metilação da região promotora, também em resposta à sinalização por Ras/ERK e pela DNA metiltransferase 3b, como demonstrado por Chang *et al.* (2006). Neste trabalho foram realizados experimentos com 5'-azacitidina na linhagem murina de fibroblastos NIH 3T3 transformada pelo oncogene H-*ras*. 5'-azacitidina é um inibidor da metilação do DNA, e na sua presença verificou-se aumento da transcrição de *RECK*. Long *et al.* (2008) identificou a correlação entre a metilação do gene *RECK* e a piora do prognóstico de pacientes que apresentavam tumores de células epiteliais escamosas orais.

Outros agentes capazes de modular a expressão de *RECK* foram identificados, e eles atuam, basicamente, interferindo na sinalização Ras/ERK/Sp1. Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) aumentam a expressão de *RECK* através da interrupção da sinalização da via ERK, o que cessa a repressão sobre o seu promotor (LIU *et al.*, 2002). A proteína LMP1 do vírus Epstein-Barr, o vírus do linfoma de Burkitt, liga-se ao promotor de *RECK*, inibindo a sua transcrição (LIU *et al.*, 2003b).

Recentemente *RECK* foi identificado como um dos alvos do microRNA miR-21 (GABRIELY *et al.*, 2008). Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA que inibem a expressão de algum produto gênico com sequência parcialmente complementar à sua, por ser capaz de conduzir o mRNA desse gene alvo, à degradação ou por inibir sua tradução..

Os níveis de miR-21 estão mais elevados em alguns tipos de câncer, como em gliomas e em cânceres de estômago (ZHANG, *et al.*, 2008). Nestes tipos de tumores os níveis de *RECK* são menores do que nos tecidos saudáveis. A inibição de miR-21 provocou o aumento do mRNA de *RECK* em gliomas, e a mutação na sequência do gene *RECK* reconhecida pelo miR-21 resultou na presença de níveis mais elevados do seu transcrito (GABRIELY *et al.*, 2008).

Hatta *et al.* (2009) estudaram os efeitos da confluência e da disponibilidade de soro na expressão de RECK em cultivos de fibroblastos murinos NIH3T3, e observaram aumento da sua expressão concomitante com o aumento da densidade celular e com a redução da quantidade de soro no meio (WINNISCHOFER, 2005, HATTA *et al.*, 2009). Foram identificadas diferentes vias de sinalização que modulam a expressão de RECK em resposta à estímulos extracelulares de diversas naturezas: PI(3)K (fosfoinosítideo-3-quinase) provoca inibição de RECK em resposta à presença de soro, via ativação de Akt; Src, inibe a transcrição em condições de baixas confluências celulares e FAK (*Focal Adhesion Kinase*) transmite o estímulo para a expressão de RECK em resposta à alta confluência celular e presença de algumas proteínas de MEC, como fibronectina. A figura 6 resume a regulação da transcrição de *RECK* como é conhecida atualmente.

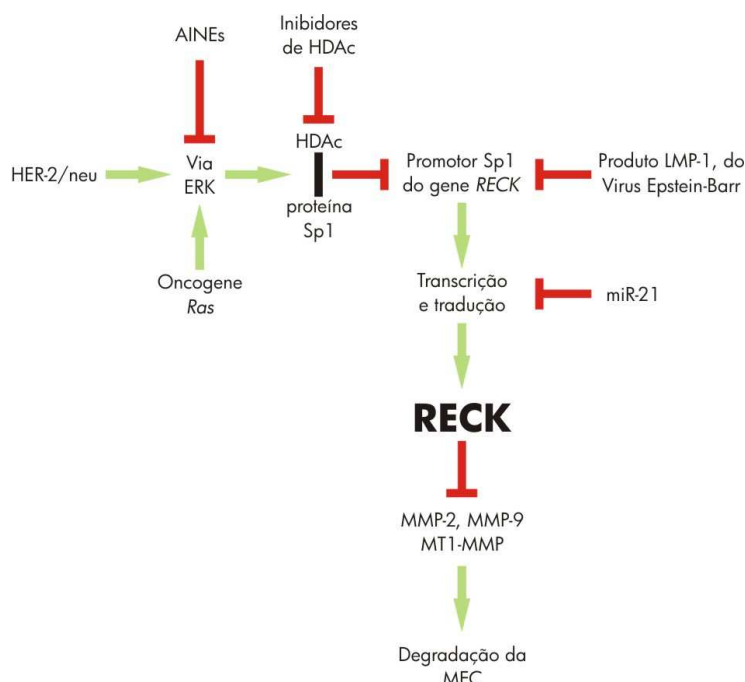


FIGURA 6 – VIAS ATUALMENTE DESCRITAS PARA A REGULAÇÃO DE RECK

FONTE: CLARK *et al.* (2007) (adaptado)

NOTA: O gene RECK está sujeito a regulação pela proteína Sp1, que se liga a uma sequência específica da região promotora de RECK e associa-se à histonas desacetilases (HDAc), provocando a inibição de sua expressão. A ligação da proteína Sp1 ao promotor de RECK é, por sua vez, regulada pela sinalização de Ras, via cascata das quinases reguladas por sinais externos (ERK). Algumas substâncias podem modular a expressão do gene RECK. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os inibidores de HDAc provocam aumento dessa expressão, enquanto o produto LMP-1 do vírus Epstein-Barr provoca a redução. Além disso, existem inibidores fisiológicos, como o microRNA-21 (miR-21) que provoca redução da síntese da proteína RECK por RNA de interferência (RNAi). As setas verdes indicam ativação, enquanto as barras vermelhas indicam inibição.

RECK pode, por fim, ser alvo de clivagens proteolíticas mediadas pela MMP-2 e pela MMP-7 quando estas estão em excesso, apesar de o significado destas interações ainda não estar elucidado (OMURA *et al.*, 2008).

2.3.4 Transcritos Alternativos de *RECK* Resultantes de Eventos de *Splicing* Alternativo

As isoformas alternativas do mRNA de *RECK* estão sendo identificadas e caracterizadas em colaboração com o grupo da Dr.^a Mari Cleide Sogayar, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Utilizando o programa BLAT (*BLAST-like Alignment Tool*) foi possível identificar transcritos alternativos de *RECK* que apresentam éxons diferenciais aos da forma canônica, sendo que a predição de seus produtos protéicos sugere a tradução de proteínas alternativas com tamanhos também diferentes. As representações dos mRNAs de cada isoforma de *RECK* encontram-se na figura 7.

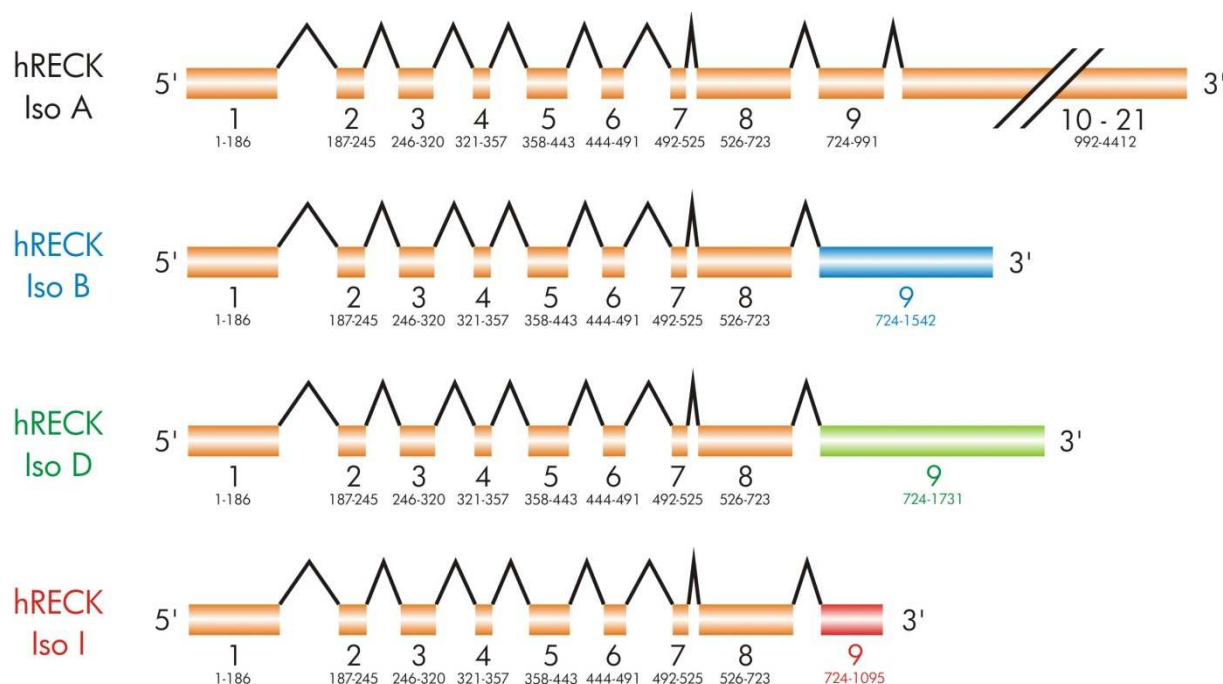


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK*
 FONTE: LIMA *et al.* (dados não publicados).

NOTA: O gene *RECK* pode dar origem a diferentes transcritos, distintos do transcrito canônico de 21 éxons. Estes transcritos alternativos foram preditos a partir da análise de bancos de dados de sequências de mRNA, através da ferramenta BLAT (*BLAST-like Alignment Tool*). As isoformas alternativas estudadas neste trabalho possuem nove éxons, de forma que o nono éxon de cada uma destas isoformas difere uma das outras, assim como diferem do nono éxon do transcrito canônico. Sendo assim, são preditos produtos proteicos diferentes para cada transcrito alternativo. Os limites de cada éxon no mRNA estão indicados na figura.

A análise da estrutura do mRNA dessas isoformas alternativas permitem a predição de algumas propriedades estruturais particularmente interessantes, como a deleção dos motivos Kazal, acompanhada ou não da perda da sequência de sinalização para a ligação o ancoramento GPI presente na forma de RECK canônica.

A figura 8 mostra a organização dos domínios preditos para os produtos protéicos codificados pelos transcritos alternativos de *RECK*. Estas predições sugerem que estes transcritos alternativos possam dar origem a produtos com atividades diferentes do produto codificado pelo transcrito canônico.

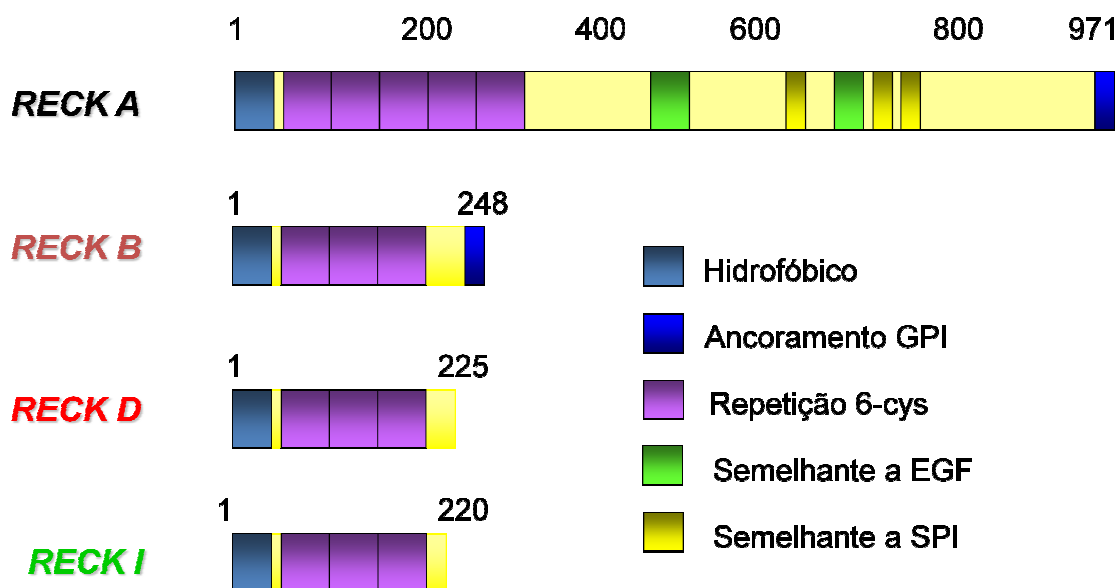


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTEICOS CODIFICADOS PELAS ISOFORMAS ALTERNATIVAS DO TRANSCRITO DE *RECK*

FONTE: LIMA *et al.* (dados não publicados).

NOTA: Os produtos protéicos preditos derivados das isoformas alternativas (RECK B, D e I) do gene *RECK* possuem algumas características da proteína canônica (RECK A), como por exemplo a presença da âncora de GPI e as repetições de cisteína. Os números indicam a posição dos resíduos de aminoácidos.

3 JUSTIFICATIVA

O melanoma é o tipo de câncer de pele que mais causa mortes no mundo todo. Este tipo de tumor apresenta uma forte tendência a sofrer metástase e se mostra resistente às terapias empregadas atualmente, com elevados índices de recorrência, conferindo ao paciente um prognóstico muito ruim, com uma taxa de sobrevida muito baixa.

A metástase é, em parte, decorrente da ação de MMPs cuja expressão está aumentada em diversos tipos de tumores. O aumento nos níveis destas enzimas proteolíticas promove maior degradação da MEC, comprometendo a estrutura do tecido e facilitando os processos de invasão. Os inibidores de MMPs – RECK e TIMPs – possuem papel importante para contrabalançar a atividade proteolítica, mantendo a homeostase da MEC.

RECK, um regulador de MMPs, tem se mostrado um importante fator no prognóstico de vários tipos de câncer. Apesar disso, são escassos os estudos sobre o papel de RECK em melanoma. Também não há disponível, até o presente momento, estudos sobre as características e funções das possíveis isoformas resultantes de *splicing* alternativo de *RECK*, cujas sequências encontram-se depositadas nos bancos de dados disponíveis para livre acesso.

A avaliação da expressão de MMPs e dos seus inibidores, como a forma canônica do transcrito de *RECK*, e de *TIMPs*, são importantes para que sejam estabelecidas as relações entre os níveis de expressão destes genes e a progressão do melanoma, contribuindo com a melhor compreensão dos mecanismos moleculares que levam à progressão tumoral. Tal compreensão pode levar à identificação de possíveis alvos moleculares com significância no diagnóstico e no tratamento do melanoma.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização da expressão de *MMPs* sabidamente importantes para a progressão tumoral, *RECK* e seus transcritos resultantes de *splicing* alternativo e de *TIMPs* em diferentes linhagens de melanoma humano que caracterizam o avanço pelas fases de progressão do modelo de Clark, de modo a verificar uma possível modulação de expressão desses genes e estabelecer possíveis correlações entre estas diferentes moléculas no contexto da progressão tumoral.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nas linhagens de melanoma humano isoladas de lesões de diferentes estágios de progressão:

- Determinar os níveis de expressão dos transcritos canônico e alternativos do gene *RECK*;
- Determinar os níveis de expressão dos transcritos de *TIMP1* e de *TIMP2*;
- Determinar os níveis de expressão dos transcritos de *MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP*;
- Determinar os níveis da proteína canônica *RECK*;
- Determinar a quantidade de pro-formas e formas ativas das enzimas proteolíticas *MMP-2* e *MMP-9* e;
- Correlacionar a expressão e/ou atividade dos genes de interesse com as etapas de progressão do melanoma, representadas pelas diferentes linhagens utilizadas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA

Foram utilizadas linhagens de melanoma humano que representam diferentes fases da progressão do tumor: fase de crescimento radial (RGP – WM35 e WM1552); fase de crescimento vertical (VGP – WM793 e WM278) e; fase metastática (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu). As linhagens utilizadas são listadas na Tabela 1, juntamente com algumas características fenotípicas que elas apresentam (eficiência na formação de colônias em ágar), marcadores moleculares característicos de melanomas (presença de integrina $\alpha_v\beta_3$ e mutação em *BRAF*) e informações sobre o *background* e a fase de progressão da doença quando as mesmas foram isoladas. Estas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Meenhard Herlyn, do Wistar Institute, Philadelphia, PA, EUA.

As células foram cultivadas em meio Tu, que consiste em 80% de meio MCDB153 (Sigma), 20% do meio L15 de Leibovitz (Sigma), 2mM CaCl_2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ insulina (Sigma), suplementado com 2% soro fetal bovino (FBS) (Gibco), e incubadas em estufa Sanyo com atmosfera de 2,5% CO_2 , a 37°C.

As culturas foram repicadas quando as células atingiam uma densidade equivalente a 80% da densidade de saturação, utilizando solução de tripsina 0,1% contendo 1mM EDTA. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENÉTICAS DAS LINHAGENS DE MELANOMA UTILIZADAS

		EFC (%) *	Integrina $\alpha_v\beta_3^*$	Mutação em <i>BRAF</i> *	Informações Adicionais
RGP	WM35	~1	+	V600I	STAT3 hipofosforilada (OKA <i>et al.</i> , 2009)
	WM1552	8,32	-	V600E	
VGP	WM278	4,20	+	V600E	Desenvolveu metástase no paciente.**
	WM793	3,71-7,20	+	V600E	Não desenvolveu metástases no paciente.**
Met	WM9	31,82	+	n. d.	Cópia extra do cromossomo 7*, deleção do braço longo do cromossomo 6*.
	WM1617	n. d.	+	V600E	Linhagem derivada de metástase em linfonodo do tumor primário que originou a linhagem WM278.*
	WM852	22,7	n. d.	WT**	
	1205Lu	25,0	+	V600E	Linhagem derivada de metástase em pulmão de camundongo a partir da injeção subcutânea de células da linhagem WM793*

FONTE: *Hsu, Elder e Herlyn (1998); **Tsai *et al.*, 2008
 NOTA: EFC, eficiência na formação de colônias em ágar.

5.2 EXTRAÇÃO DO RNA E SÍNTESE DO cDNA

Foram plaqueadas 5×10^5 células em placas de 60mm. As culturas foram mantidas a 37°C numa atmosfera com 2,5% de CO₂, e coletadas depois de 48h. O RNA total foi isolado utilizando o kit RNeasy (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. O RNA total obtido de cada amostra foi então quantificado espectrofotometricamente. A síntese do cDNA poliA⁺ foi feita a partir de 1µg de RNA total, utilizando *primers* Oligo dT⁽¹⁸⁾ (Fermentas Biotech) e a enzima SuperScript III (Invitrogen), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão dos genes de interesse foi quantificada nas linhagens de melanoma humano que caracterizam as diferentes etapas da progressão maligna: RGP (WM35 e WM1552), VGP (WM278 e WM793) e metastáticas (1205Lu, WM9, WM1617 e WM852), comparando as quantidades de mRNA de cada gene de interesse em relação à de expressão de genes constitutivos na célula (controles internos). Nesse trabalho foram utilizados 3 controles internos para normalização:

1. hGAPDH, que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima da via glicolítica;
2. hHPRT, gene que codifica para a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, que é uma enzima do metabolismo de purinas e;
3. hHMBS, que codifica a porfobilinogênio deaminase (hidroximetilbilano sintase), enzima da biossíntese do heme.

Para isso, os cDNAs, obtidos de cada linhagem, foram diluídos 30 vezes e utilizados nas reações de qRT-PCR. Todos os experimentos foram realizados no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando SYBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e *primers* específicos para os genes de interesse. As eficiências dos *primers* foram determinadas de acordo com o método descrito por Schmittgen e Livak (2008). A reação seguiu as curvas de temperatura padrão do equipamento, repetidos por 40 ciclos. A expressão dos genes foi apresentada como valores relativos à média geométrica entre as expressões de três genes endógenos de expressão constitutiva e independente da progressão dos tumores: *GAPDH*, *HPRT* e *HMBS*, através do programa geNorm v. 3.4, que utiliza o método descrito por Vandesompele *et al.* (2002).

5.3.1 *Primers* Utilizados

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express® v. 2.0 da Applied Biosystems e foram avaliados quanto a especificidade utilizando o programa BLAST, comparando com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

As sequências dos *primers* utilizados nos experimentos de qPCR em tempo real estão descritas na tabela 2.

TABELA 2 – SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE qRT-PCR

Gene	Concentração	Sentido	Sequência
hRECK Iso A	600 nM	F:	5'-ATGCACTGTATAGACCTCCAGAAGTC-3'
		R:	5'-CAGTCAATACTAAAGGATGTTCCATGA-3'
hRECK Iso B	600 nM	F:	5'-TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA-3'
		R:	5'-CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC-3'
hRECK Iso D	600 nM	F:	5'-AATGAGGAACCCAACGGATATGT-3'
		R:	5'-TCAGGCTCTCTTCTCATTGTTATGACT-3'
hRECK Iso I	600 nM	F:	5'-ATGAGGAACCCAACGGATAGCAG-3'
		R:	5'-GCCATCTCCTTAGCTCCAGCAGTA-3'
hMMP-2	600 nM	F:	5'-AGCTCCCGGAAAAGATTGATG-3'
		R:	5'-CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT-3'
hMMP-9	200 nM	F:	5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3'
		R:	5'-GATTTGACTCTCCACGCATCT-3'
hMT1-MMP	600 nM	F:	5'-GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA-3'
		R:	5'-TCGAACATTGGCCTTGATCTC-3'
hTIMP-1	400 nM	F:	5'-CCGCAGCGAGGAGTTTCTC-3'
		R:	5'-GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA-3'
hTIMP-2	600 nM	F:	5'-CGACATTTATGGCAACCCTATCA-3'
		R:	5'-GCCGTGTAGATAAACTCTATATCC-3'
hHMBS	200 nM	F:	5'-TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT-3'
		R:	5'-CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC-3'
hGAPDH	400 nM	F:	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
		R:	5'-CTGTTGCTGTAGCCAATTTCGT-3'
hHPRT	200 nM	F:	5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3'
		R:	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

FONTE: O Autor

5.4 ZIMOGRÁFIA

5 x 10⁵ células foram transferidas para placas de 60mm. Após a adesão das células, estas foram lavadas e cultivadas em meio Tu livre de FBS, adicionado de BSA 0,1% (Sigma) por 72h. O meio foi coletado e as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry. 25µg de proteínas foram misturados com tampão contendo SDS, livre de agentes redutores. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 10% copolimerizado com 1mg/mL gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados com solução Triton-X 2,5% por 30 minutos a 37°C e então incubados em tampão contendo 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 10mM CaCl₂ e 1µM ZnCl₂ por 16h. Os géis foram fixados e corados utilizando Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), dissolvido em solução água:metanol:ácido acético glacial 6:3:1. A remoção do excesso de corante foi feita utilizando solução água:metanol:ácido acético glacial 8:1:1. A atividade

proteolítica foi observada pelas bandas não coradas nos géis, analisadas com o programa ImageJ versão 1.42q (National Institutes of Health, USA).

5.5 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS E ENSAIO DE *WESTERN BLOTTING*

As células de melanoma foram coletadas e adicionadas de tampão de extração de proteínas (100mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 0.1mg Aprotinina, 35mg PMSF/ml, e 4mM EDTA). As amostras foram homogeneizadas até se tornarem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos para remoção de fragmentos celulares. Alíquotas com mesma concentração proteica foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em cuba para mini gel BioRad e as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando cuba Omniphor. As membranas foram incubadas por 12h com solução de bloqueio (5% leite em tampão Tris-HCl contendo 10mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, e 0,02% Tween20) a 4°C. A membrana bloqueada foi incubada com anticorpo primário específico e então lavada por 1h com tampão Tris-HCl. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 12h a 4°C, e então lavadas em tampão TBST. A revelação foi feita utilizando o substrato quimioluminescente para peroxidase (Sigma).

5.5.1 Antisoros

Os antisoros que serão utilizados neste projeto são:

- Antisoros primários: antisoro monoclonal de camundongo anti-hRECK (BD Biosciences) diluído 1:500 e antisoro monoclonal de coelho anti- β -actina (Sigma) diluído 1:1000;
- Antisoros secundários: anti mouse IgG conjugado com peroxidase (Sigma, USA e Vector Laboratories, USA) e anti rabbit IgG conjugado com peroxidase, ambos na concentração 1:5000.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para a comparação da expressão de um determinado gene entre as três etapas da progressão utilizou-se ANOVA unidirecional com teste de Kruskal-Wallis. Comparação entre apenas dois grupos de dados foram feitas utilizando teste t. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de p menor que 0,05.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS CANÔNICO E ALTERNATIVOS DO GENE *RECK* EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE REPRESENTAM DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA

Os níveis de expressão dos transcritos canônico (Isoforma A) e alternativos (isoformas B, D e I) do gene *RECK* foram avaliados por qRT-PCR (conforme descrito no item 5.3 da seção “Material e Métodos”) nas linhagens derivadas de melanomas humanos nas fases de crescimento radial (RGP), crescimento vertical (VGP) ou derivadas de lesões metastáticas. O resultado obtido está representado na Figura 9.

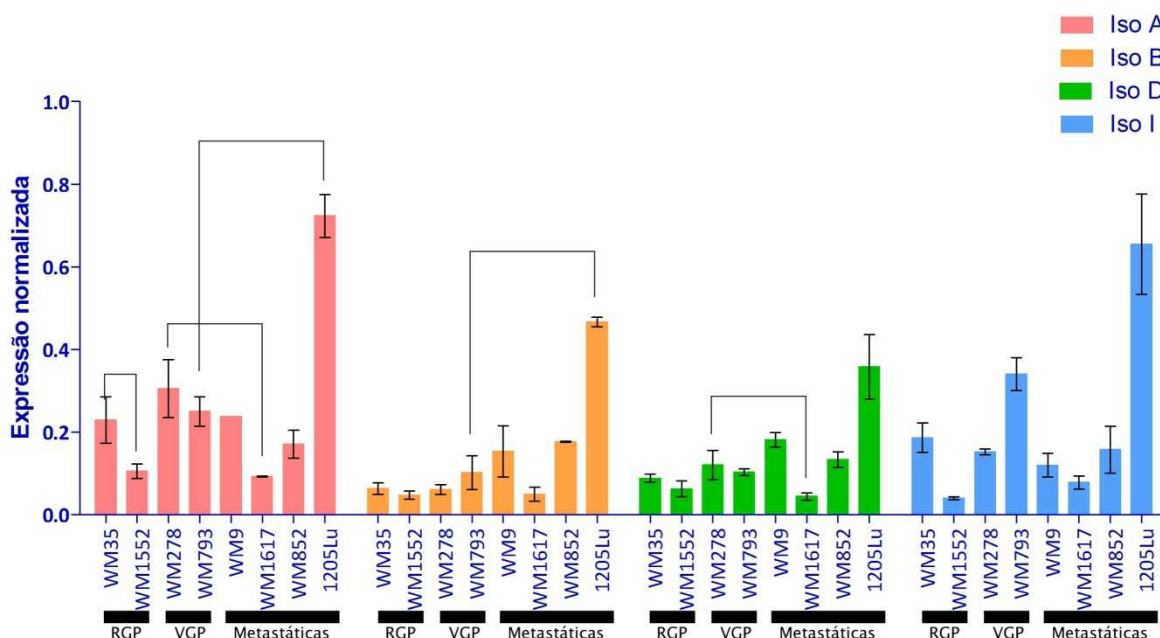


FIGURA 9 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS CANÔNICO (ISOFORMA A) E ALTERNATIVOS DE *RECK* EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO
 FONTE: O Autor (2010).

NOTA: O RNA total foi isolado de linhagens RGP (WM35, WM1552), VGP (WM278 e WM793) e metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu) e o RNA poliA⁺ foi transcrito para cDNA. A quantificação dos cDNAs correspondentes à cada isoforma de *RECK* foi feita por qRT-PCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa de cada transcrito, normalizada como descrito no item 5.3 da seção “Material e Métodos”. As barras indicam a média e o desvio padrão resultantes de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças significativas ($p < 0,05$, teste t) relevantes são indicadas pelas linhas ligando as barras correspondentes.

As isoformas A, B, D e I de *RECK* foram detectáveis nos 40 ciclos da reação de qPCR, e estão expressas em todas as linhagens analisadas.

Com relação à isoforma A, verificou-se que esta encontra-se mais expressa na linhagem metastática 1205Lu. A linhagem WM1617 é a linhagem metastática que menos expressa esta isoforma.

A linhagem RGP WM35 apresenta uma expressão cerca de duas vezes maior que a da sua congênere, WM1552 ($p=0,0344$).

Foi possível verificar ainda que a isoforma A de *RECK* é aproximadamente três vezes mais expressa na linhagem VGP WM278 do que na linhagem WM1617, sua derivada metastática ($p=0,0320$). Já na linhagem WM793 (VGP) os níveis da isoforma A equivalem a um terço da expressão na sua derivada metastática, 1205Lu ($p=0,0089$). Esta diferença entre os dois pares de linhagens correlatas pode decorrer das diferentes naturezas das duas lesões metastáticas (ver tabela 1, item 5.1 da seção “Material e Métodos”), uma vez que a linhagem WM1617 é derivada de uma lesão metastática que teve origem no mesmo paciente que a linhagem WM278 foi isolada, enquanto que a linhagem 1205Lu é derivada de uma metástase pulmonar originada da injeção de células WM793 na veia caudal de camundongos imunodeficientes (SATYAMOORTHY *et al.*, 1997). Portanto as etapas pelas quais as linhagens VGP citadas passaram para gerar a lesão metastática foram diferentes em cada caso e, portanto, a progressão de cada par teve o seu próprio conjunto de características determinantes para a seleção da célula que originou a lesão metastática. É importante ressaltar que a linhagem WM793 não originou metástase no paciente do qual isolou-se o tumor que lhe deu origem (HSU, ELDER e HERLYN, 1998).

No que diz respeito à isoforma B, novamente a linhagem que apresenta maior nível de expressão é a metastática 1205Lu. A linhagem metastática WM1617 é a que menos expressa esta isoforma.

Entre as duas linhagens RGP não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão da isoforma B. Foi observada diferença significativa entre a expressão desta isoforma na linhagem 1205Lu em relação à WM793 (aproximadamente cinco vezes mais alta na linhagem metastática, $p=0,0013$). Não foi observada, porém, diferença entre as linhagens WM278 e WM1617.

Quanto a isoforma D, observa-se novamente maior expressão na linhagem 1205Lu, enquanto a linhagem WM1617 expressa os menores níveis.

Os níveis deste transcrito nas linhagens RGP são equivalentes. Já nos pares correlatos WM278/WM1617 há alteração significativa de expressão, com redução

dos níveis da isoforma D na linhagem metastática WM1617 em ~60% em relação a linhagem do tumor primário ($p=0,0222$).

A isoforma I, por sua vez, é expressa em níveis mais elevados na linhagem 1205Lu. Os níveis mais baixos deste transcrito foram encontrados na linhagem WM1552. Entre as RGP's esta isoforma encontra-se mais abundante na linhagem WM35. As diferenças entre as linhagens WM278/WM1617 e WM793/1205Lu não são estatisticamente significativas.

Para avaliar se existe uma tendência geral de modulação da expressão das isoformas de *splicing* do transcrito de *RECK* em relação às diferentes características das linhagens celulares de melanoma utilizadas neste estudo, foi realizada uma análise da expressão destes transcritos considerando cada linhagem celular como pertencente a um grupo celular específico, caracterizado pelo estágio da lesão de onde esta linhagem foi isolada (RGP, VGP ou Metastática). Os resultados são mostrados na figura 10.

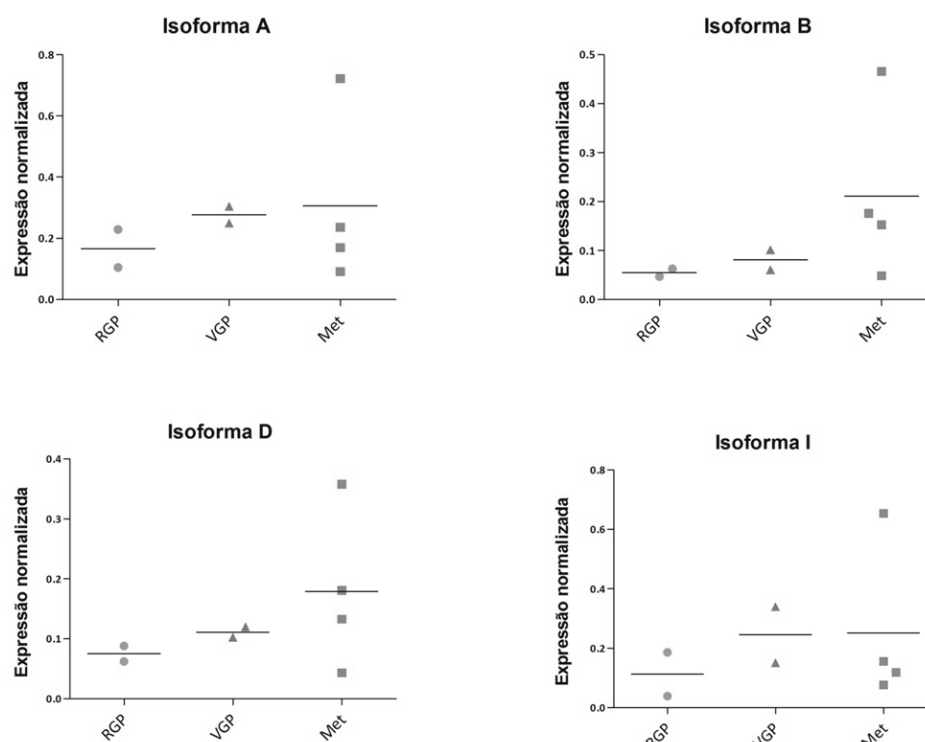


FIGURA 10 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DE *RECK* DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA
 FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Os dados obtidos da quantificação do mRNA de cada gene indicado, nas linhagens de melanoma humano, foram agrupados de acordo com o grau da progressão de cada linhagem em RGP, fase de crescimento radial (WM35 e WM1552); VGP, fase de crescimento vertical (WM278 e WM793); Met, linhagens metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu). As barras horizontais indicam as médias dos valores obtidos para as linhagens do grupo. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

Foi verificado que apesar da ocorrência de modulações pontuais dos níveis de expressão dos transcritos de *RECK* em pares de linhagens indicados anteriormente (WM35/WM1552, WM278/WM1617 e WM793/1205Lu), não foi observada nenhuma tendência global de modulação da expressão dos transcritos do gene *RECK* durante a progressão maligna do melanoma representadas por estas linhagens. Isto reflete a heterogeneidade das linhagens analisadas, mesmo quando comparadas com linhagens isoladas de lesões do mesmo estágio de progressão. Um exemplo marcante dessa heterogeneidade é o fato de que tanto a linhagem que expressa os transcritos alternativos de *RECK* em níveis mais altos quanto a que as expressa em níveis mais baixos foram isoladas de lesões metastáticas.

Para estabelecer uma correlação entre o estágio de progressão representado pelas diferentes linhagens e a alteração do padrão de *splicing* do transcrito primário do gene *RECK* foi avaliada a abundância de cada transcrito alternativo em relação ao transcrito na sua forma canônica (isoforma A). Os dados estão representados na Figura 11.

Foi verificado que todas as linhagens expressam a isoforma B em níveis mais baixos ou equivalentes aos da forma canônica. Dentre estas linhagens, observou-se que o evento de *splicing* que dá origem à isoforma B tende a ocorrer com maior frequência na linhagem metastática WM852. Na progressão da VGP WM278 para a metástase WM1617 houve aumento significativo na razão isoforma B/isoforma A de *RECK* ($p=0,0432$). Este aumento não foi verificado na progressão WM793/1205Lu.

A razão isoforma D/isoforma A não é pronunciadamente diferente em nenhuma linhagem. Duas linhagens metastáticas, WM9 e WM852, apresentam essa razão um pouco mais elevada, mas não houve aumento significativo nas progressões WM278/WM1617 ou WM793/1205Lu.

A isoforma I é expressa de forma mais heterogênea, e a razão isoforma I/isoforma A indica que este transcrito é mais abundante do que a forma canônica de *RECK* na linhagem WM793. Observamos aqui, porém, comportamentos opostos entre os pares de linhagens correlatas; temos que a progressão WM278/WM1617 promoveu um aumento significativo de expressão na relação Isoforma I/Isoforma A ($p=0,001$), enquanto que a progressão no WM793/1205Lu levou à uma redução significativa dessa razão ($p=0,0444$). Outro contraste no comportamento desta isoforma é observado entre as linhagens RGP WM35 e WM1552. A razão isoforma

Isoforma A em WM35 foi mais alta que da sua congênera, o oposto do que foi observado nas outras isoformas.

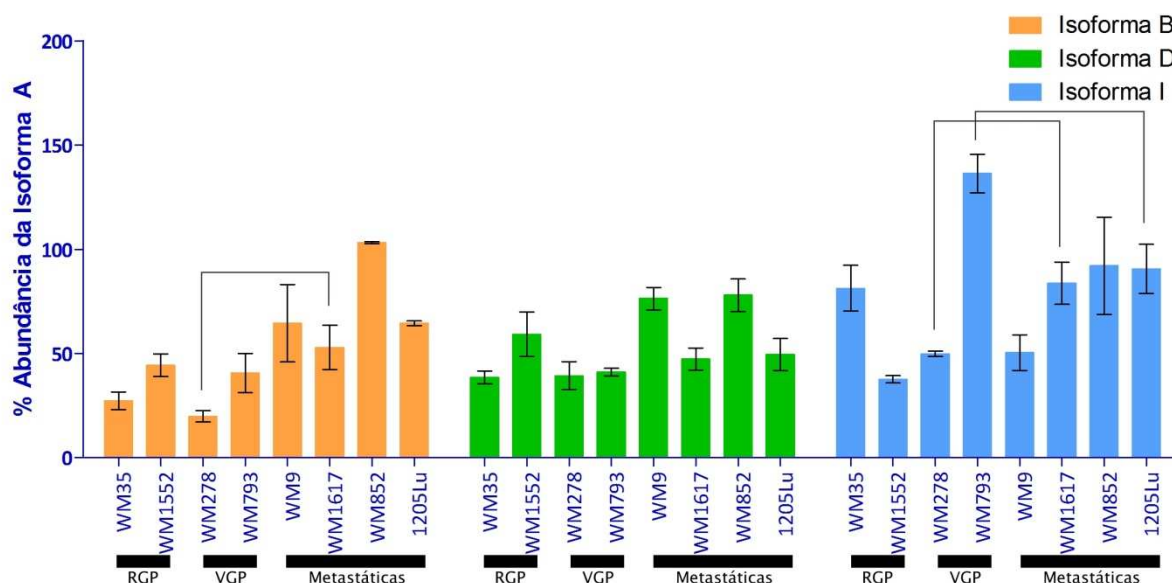


FIGURA 11 – ABUNDÂNCIA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS EM RELAÇÃO À DO TRANSCRITO CANÔNICO DO GENE *RECK* EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Os valores obtidos na quantificação de cada transcrito indicado, nas linhagens de melanoma humano dos estágios RGP (WM35 e WM1552), VGP (WM278 e WM793) e metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu) (apresentados na figura 9), foram utilizados para o cálculo das razões Isoforma Alternativa/Isoforma canônica de *RECK*. As barras indicam o percentual da abundância de cada isoforma em relação à forma canônica. As diferenças significativas ($p < 0,05$, teste t) relevantes são indicadas pelas linhas ligando as barras correspondentes.

Para detectar as variações nestas razões durante a progressão (e não entre linhagens individuais), as linhagens foram agrupadas de acordo com os graus de progressão do melanoma que elas representam. Como o comportamento entre RGPs e VGP mostrou-se semelhante para as razões isoforma B/isoforma canônica e isoforma D/isoforma canônica, as duas classes foram agrupadas. Os resultados são mostrados na figura 12.

Observa-se que a diferença entre as razões isoforma B/isoforma A dos grupos RGP+VGP e metastáticas foi significativa ($p = 0,0367$, teste t com correção de Welch), evidenciando que a isoforma B de *RECK* é significativamente mais expressa no grupo de linhagens metastáticas em relação à isoforma canônica.

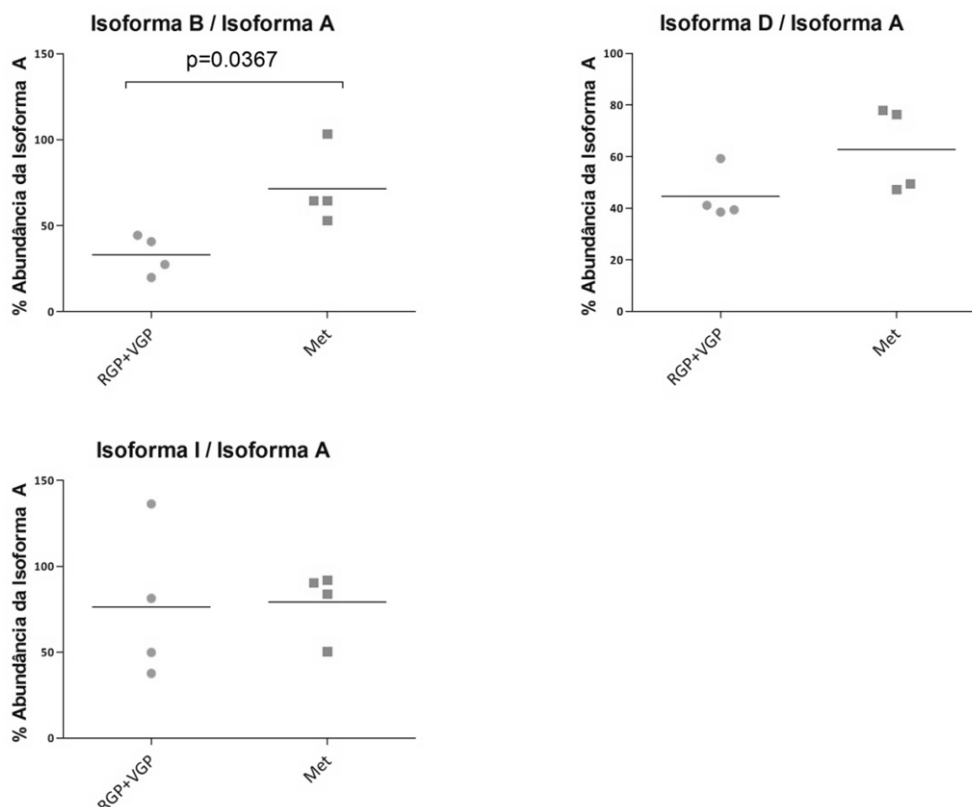


FIGURA 12 – ALTERAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK* EM RELAÇÃO À SUA FORMA CANÔNICA DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Os valores obtidos na quantificação de cada transcrito indicado foram utilizados para calcular as razões isoformas alternativas/isoforma canônica de *RECK*. Os resultados foram agrupados de acordo com o grau da progressão de cada linhagem em RGP+VGP, linhagens das fases de crescimento radial e vertical (WM35, WM1552, WM278 e WM793), e Met, linhagens metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu). As barras horizontais indicam as médias dos valores obtidos para as linhagens do grupo. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. O valor de p está indicado onde a diferença foi significativa ($p < 0,05$, Teste t com correção de Welch).

É importante ressaltar que os dados sobre expressão de *RECK*, quando analisados individualmente, não representam todo o contexto do equilíbrio da degradação da MEC, pois este equilíbrio depende do balanço entre inibidores e MMPs. Deste modo, a ausência de modulação significativa dos níveis do transcrito canônico de *RECK* durante a progressão maligna do melanoma não indicam necessariamente a não-participação de *RECK* no avanço da doença. Para se avaliar de forma adequada o papel de *RECK* na progressão, analisou-se os níveis dos transcritos dos inibidores solúveis de MMPs: *TIMP1* e de *TIMP2*. A seguir foram realizadas análises de expressão de MMPs que são alvos da inibição de *RECK*: *MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP*.

6.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *TIMP1* E *TIMP2* EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE REPRESENTAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA

A quantificação dos transcritos dos genes de inibidores solúveis de MMPs, *TIMP1* e *TIMP2*, foi realizada por qRT-PCR, de acordo com o descrito no item 5.3 da seção “Material e Métodos”, em linhagens derivadas de melanomas dos estágios RGP, VGP e Metastático. O resultado é mostrado na figura 13.

Observou-se que a expressão de *TIMP1* não variou de forma pronunciada entre as linhagens de forma que apenas as linhagens WM793 e 1205Lu apresentam níveis um pouco mais elevados em relação às demais linhagens. Entretanto, entre estas duas linhagens e entre as linhagens WM278 e WM1617 não há diferença significativa, mostrando a não-modulação da expressão deste gene durante estas progressões.

Já os níveis de expressão de *TIMP2* variam de forma mais destacada entre as linhagens de melanoma analisadas. Destaca-se a elevada expressão deste gene na linhagem RGP WM35 em relação à outra linhagem de mesmo grau de progressão, WM1552. Destaca-se, ainda, a elevada expressão na linhagem metastática WM9.

A expressão de *TIMP2* na linhagem metastática WM1617 é 1,7 vezes maior que na linhagem isolada da lesão VGP que lhe deu origem, WM278 ($p=0,0456$). O contrário ocorre no par WM793/1205Lu, no qual a linhagem metastática apresentou níveis menores do transcrito que na linhagem VGP ($p=0,0468$).

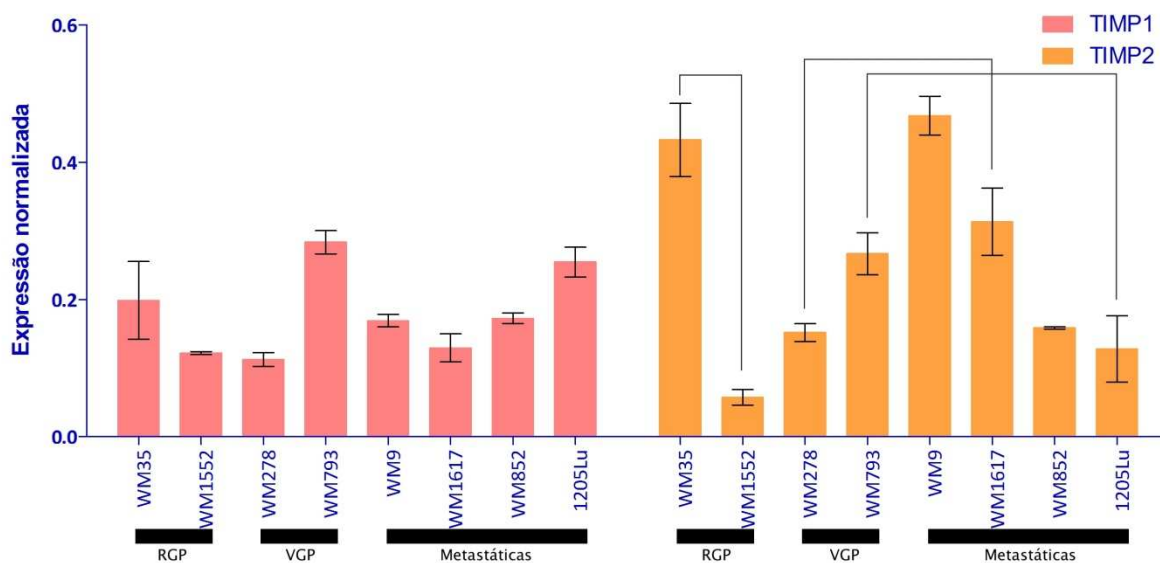


FIGURA 13 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DE *TIMP1* E *TIMP2* EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: O RNA total foi isolado de linhagens RGP (WM35, WM1552), VGP (WM278 e WM793) e metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu) e o RNA polii⁺ foi transcrito para cDNA. A quantificação dos cDNAs correspondentes à cada mRNA foi feita por qRT-PCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa de cada mRNA, normalizada como descrito no item 5.3 da seção “Material e Métodos”. As barras indicam a média e o desvio padrão resultantes de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças significativas ($p < 0,05$, teste t) relevantes são indicadas pelas linhas ligando as barras correspondentes.

Para avaliar se existe uma tendência geral de modulação da expressão de *TIMP1* e *TIMP2* em relação às diferentes características das linhagens celulares de melanoma utilizadas neste estudo, foi realizada uma análise da expressão relativa desses dois genes, agrupando as linhagens de acordo com o estágio de progressão da lesão da qual foi isolada. Os resultados estão mostrados na figura 14.

Foi verificado que não ocorre diferença significativa dos níveis de expressão destes genes entre as fases de progressão representadas pelas linhagens avaliadas.

Estes dados sobre a expressão de *TIMP1* e *TIMP2* complementam os dados sobre a expressão de *RECK*. Para completar o panorama geral do balanço proteolítico da MEC, quantificou-se também os transcritos dos genes que codificam para as metaloproteinasas de matriz extracelular que sabidamente interagem com estes inibidores.

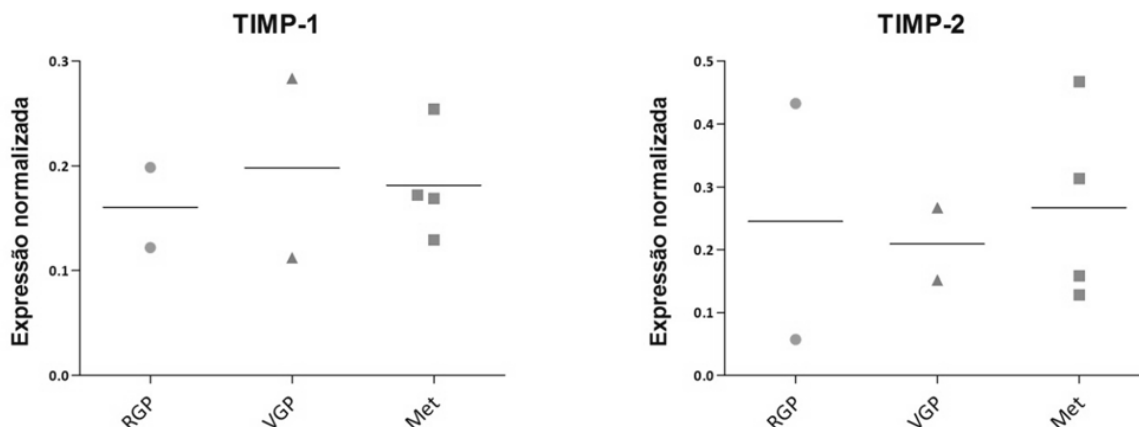


FIGURA 14 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *TIMP1* E *TIMP2* DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Os dados obtidos da quantificação do mRNA de cada gene indicado, nas linhagens de melanoma humano, foram agrupados de acordo com o estágio da progressão de cada linhagem em RGP, fase de crescimento radial (WM35 e WM1552); VGP, fase de crescimento vertical (WM278 e WM793); Met, linhagens metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu). As barras horizontais indicam as médias dos valores obtidos para as linhagens do grupo. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

6.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *MMP2*, *MMP9* E DE *MT1MMP* EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE REPRESENTAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA

Os transcritos dos genes *MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP*, cujos produtos proteicos sabidamente são regulados por RECK e por TIMPs, foram quantificados como descrito no item 5.3 da seção “Material e Métodos”. Os resultados são apresentados na figura 15.

O perfil de expressão de *MMP2* apresenta grandes variações entre as linhagens, inclusive entre aquelas isoladas de lesões de mesmo estágio de progressão. Os extremos destas discrepâncias são representadas pelos altos níveis deste transcrito na linhagem VGP WM793 e pelos níveis ínfimos na linhagem RGP WM35. Uma expressão baixa foi também encontrada na linhagem metastática WM1617, que apresentou uma redução pronunciada em relação à linhagem WM278 ($p=0,0026$). A diminuição da expressão também foi significativa na linhagem metastática 1205Lu em relação à sua linhagem parental, a VGP WM793 (seis vezes menor na linhagem metastática, $p<0,0001$).

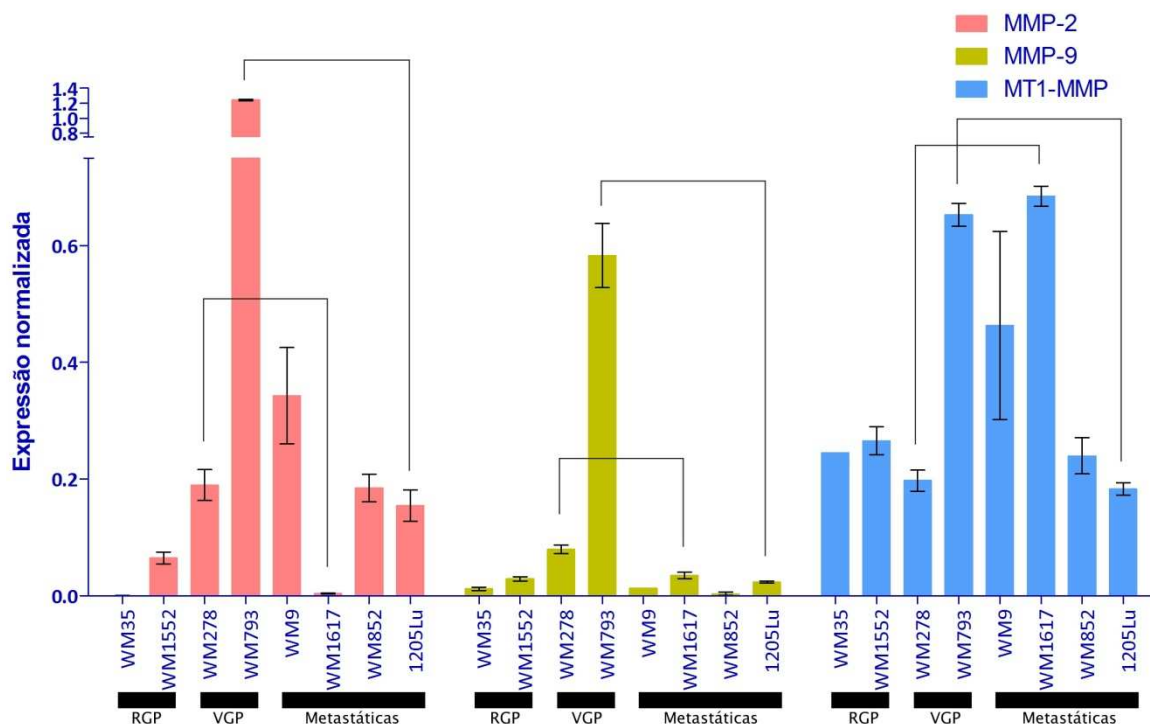


FIGURA 15 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE *MMP2*, *MMP9* E DE *MT1MMP* EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: O RNA total foi isolado de linhagens RGP (WM35, WM1552), VGP (WM278 e WM793) e metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu) e o RNA poliA⁺ foi transcrito para cDNA. A quantificação dos cDNAs correspondentes à cada isoforma do transcrito foi feita por qRT-PCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa de cada transcrito, normalizada como descrito no item 5.3 da seção “Material e Métodos”. As barras indicam a média e o desvio padrão resultantes de três experimentos independentes, realizados em duplicata. As diferenças significativas ($p < 0,05$, teste t) relevantes são indicadas pelas linhas ligando as barras correspondentes.

A expressão de *MMP9* também mostrou-se mais elevada na linhagem WM793 em comparação com as demais linhagens analisadas neste estudo. Nas demais linhagens, porém, observa-se expressão menos heterogênea desse gene em relação à expressão de *MMP2*. Observa-se, ainda, uma redução significativa da expressão de *MMP9*, tanto na progressão WM793/1205Lu ($p=0,0048$), quanto na progressão WM278/WM1617 ($p=0,0044$).

Os níveis do transcrito de *MT1MMP*, por sua vez, são divergentes em duas linhagens: na linhagem WM793, derivada de lesão VGP, e na linhagem metastática WM1617, porém, sendo semelhantes nestas duas linhagens entre si. A expressão de *MT1MMP* nas demais linhagens encontra-se em níveis equiparáveis. Aumento estatisticamente significativo de cerca de três vezes ocorre entre a lesão primária representada pela WM278 e a metástase originada desta lesão, WM1617 ($p=0,0013$). Comportamento este inverso ao que ocorre na progressão da lesão

representada por WM793 para a metástase 1205Lu, no qual há redução significativa de três vezes ($p=0,0011$).

Novamente, para verificar a tendência global de modulação da expressão destes genes, os valores relativos de expressão das diferentes *MMPs* obtidos em cada linhagem foram agrupados de acordo com o estágio da progressão da lesão da qual ela foi isolada. O resultado é mostrado na figura 16. Apesar das observações pontuais de modulação de expressão gênica nos pares WM278/WM1617 e WM793/1205Lu, nenhuma tendência global de modulação foi significativa no modelo estudado.

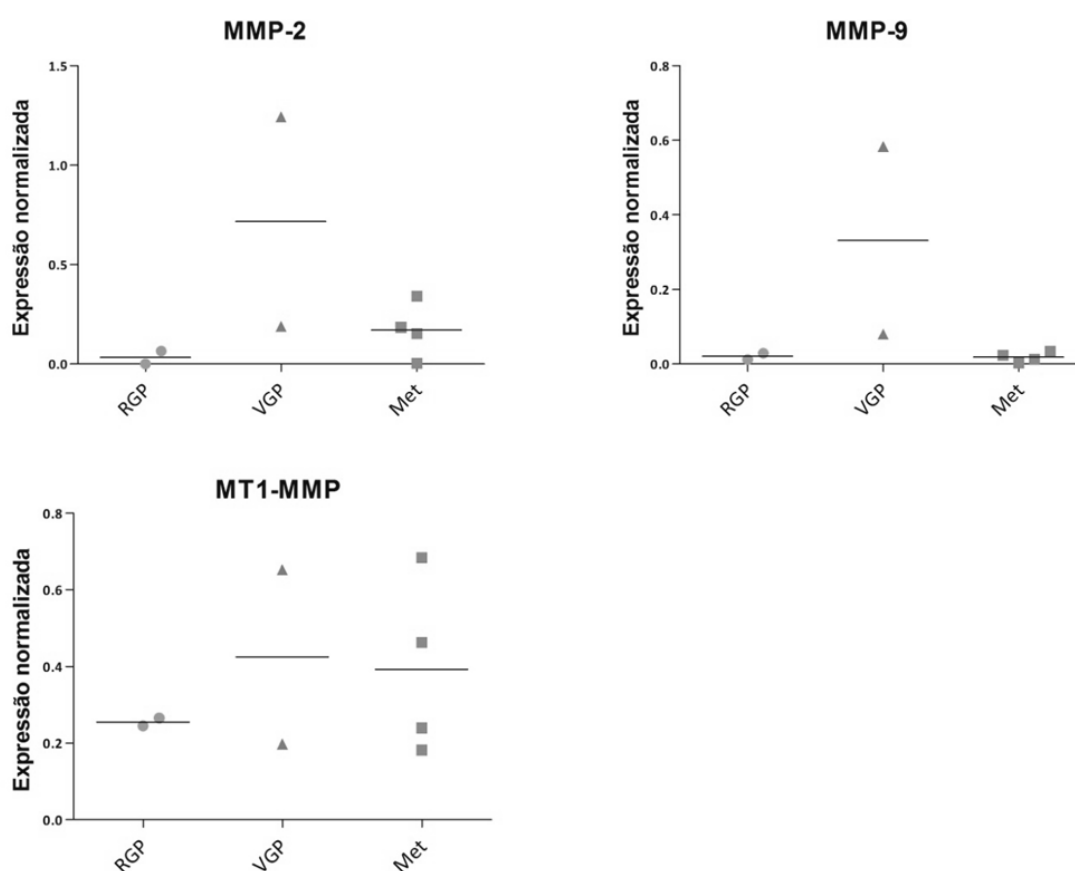


FIGURA 16 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *MMP2*, *MMP9* E *MT1MMP* DURANTE A PROGRESSÃO MALIGNA DO MELANOMA.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Os dados obtidos da quantificação do mRNA de cada gene indicado, nas linhagens de melanoma humano, foram agrupados de acordo com o estágio da progressão de cada linhagem em RGP, fase de crescimento radial (WM35 e WM1552); VGP, fase de crescimento vertical (WM278 e WM793); Met, linhagens metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu). As barras horizontais indicam as médias dos valores obtidos para as linhagens do grupo. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

De posse dos dados sobre a expressão dos transcritos que codificam para *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP*, juntamente com os dados sobre os níveis de

transcritos que codificam para as moléculas inibidoras RECK, TIMP-1 e TIMP-2, foi possível determinar as razões entre os níveis de mRNA que codificam para os inibidores e os que codificam para as metaloproteinases.

As razões Inibidores/MMPs calculadas para todas as linhagens analisadas foram agrupadas de acordo com o estágio da progressão da lesão da qual as mesmas foram isoladas, e estão apresentadas na figura 17.

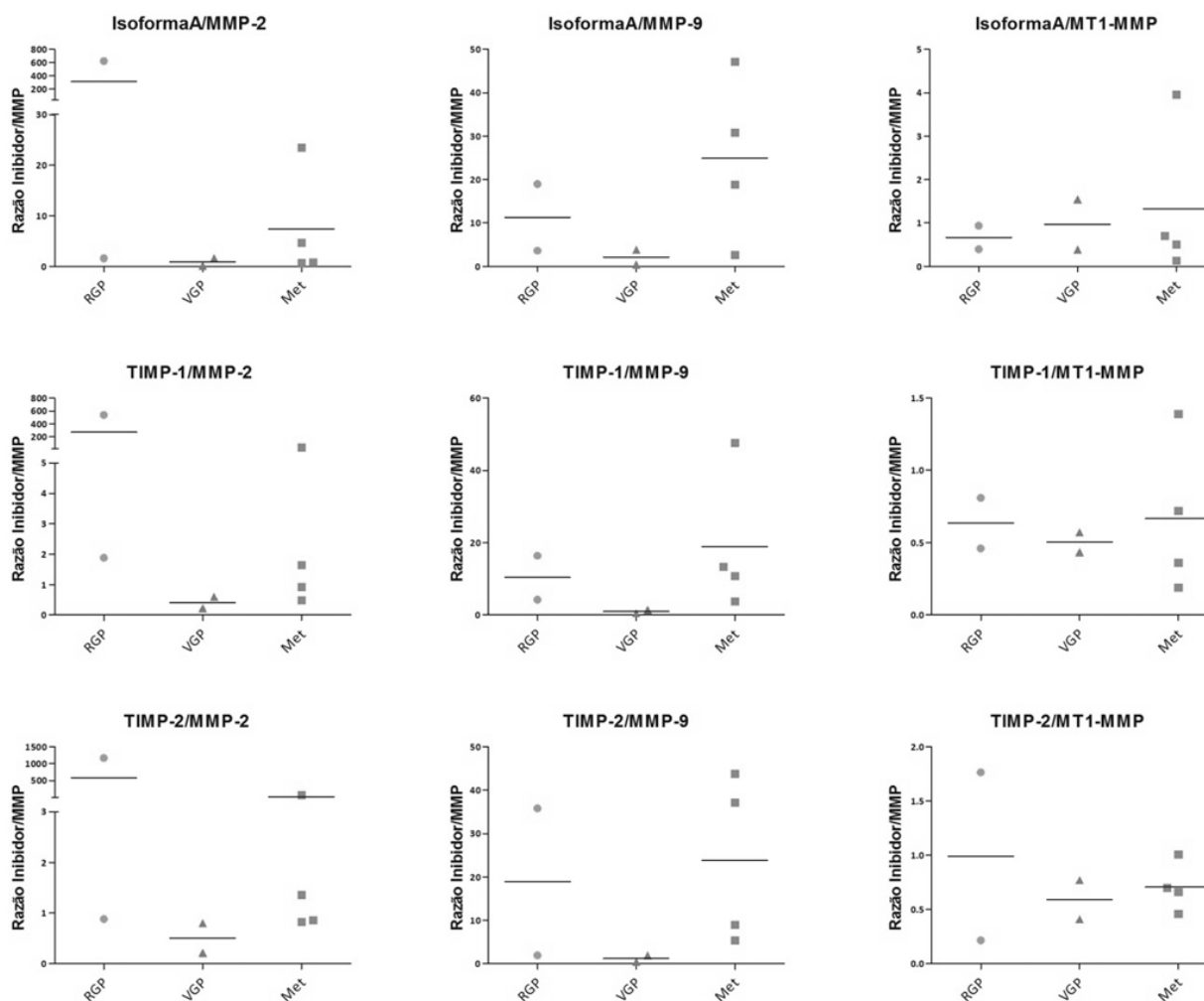


FIGURA 17 – MODULAÇÃO DA RAZÃO ENTRE OS DIFERENTES TRANSCRITOS DE INIBIDORES DE MMPs E DOS DIFERENTES TRANSCRITOS DE MMPs EM CÉLULAS DE MELANOMA QUE REPRESENTAM FASES DISTINTAS DA PROGRESSÃO MALIGNA.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: Os valores obtidos na quantificação do mRNA de cada gene indicado foram utilizados para calcular as razões Inibidores/MMPs. Os resultados foram agrupados de acordo com o grau da progressão de cada linhagem em RGP, fase de crescimento radial (WM35 e WM1552); VGP, fase de crescimento vertical (WM278 e WM793); Met, linhagens metastáticas (WM9, WM1617, WM852 e 1205Lu). As barras horizontais indicam as médias dos valores obtidos para as linhagens do grupo. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

Não foi observada tendência de alteração nas razões Inibidores/MMPs de forma geral durante a progressão do melanoma para nenhum dos inibidores analisados neste estudo em relação à modulação de expressão das três MMPs avaliadas (*MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP*).

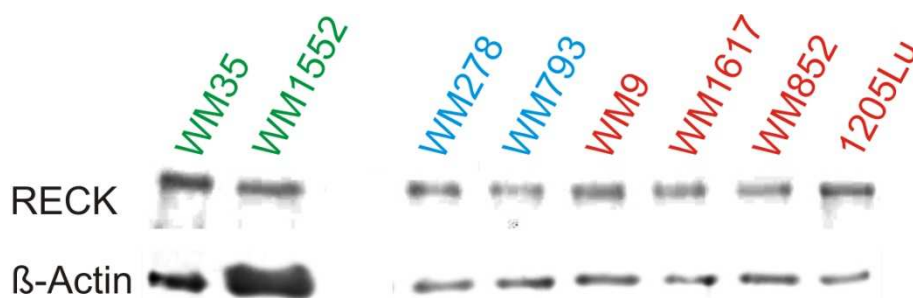
Em seguida, os níveis da proteína canônica RECK nas diferentes linhagens foram quantificados, para verificar se os níveis do transcrito em cada linhagem seguiam o mesmo perfil de expressão. Para este mesmo fim, a atividade de MMP-9 e MMP-2 foi avaliada através de ensaios de zimografia.

6.4 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DA FORMA CANÔNICA DE RECK EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA

Para verificar se o perfil de expressão do transcrito canônico do gene *RECK* (figura 9) correlacionava-se de fato com a quantidade da proteína expressa em cada linhagem foi realizado o *imunoblotting* com as proteínas totais extraídas das células das diferentes linhagens RGP, VGP e metastáticas. A proteína β -actina, expressa constitutivamente nestas células, foi utilizada como controle endógeno do experimento. Os resultados obtidos estão representados na Figura 18.

O produto protéico codificado pela isoforma A de *RECK* foi detectado em todas as linhagens analisadas. A quantificação por densitometria mostrou que o perfil da variação dos níveis da proteína RECK entre as linhagens (Figura 18B) é semelhante ao perfil obtido para a variação nos níveis do mRNA desta isoforma (figura 9). Este dado, porém, deve ser considerado apenas como qualitativo, uma vez que esta quantificação foi feita a partir de um único experimento.

A



B

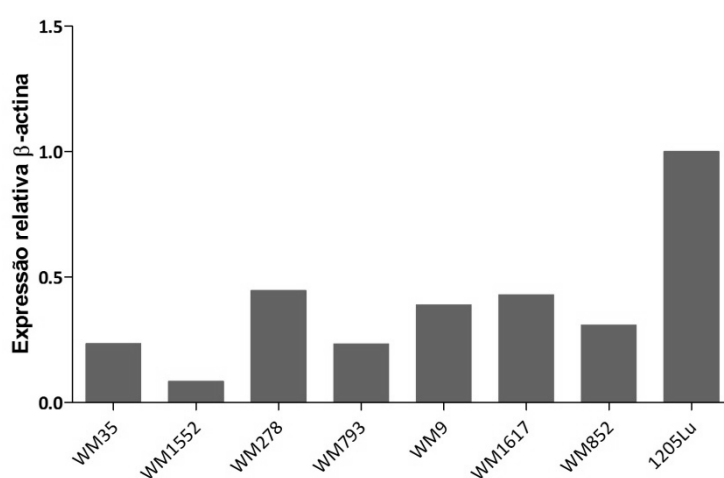


FIGURA 18 – DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECK NOS EXTRATOS DE PROTEÍNA TOTAL DE LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: As proteínas totais foram extraídas de diferentes células e submetidas ao ensaio de *Western Blotting*, como descrito no item 5.5 da seção “Material e Métodos”. **A**, *Western Blotting* de RECK (110 kDa) e da proteína de expressão constitutiva β -actina (45 kDa). A cor do nome das linhagens corresponde ao estágio de progressão do tumor que lhe deu origem: RGP, verde; VGP, azul e; Metastáticas, vermelho. **B**, quantificação da intensidade relativa das bandas de RECK, normalizadas pela intensidade das bandas de β -actina. Este é o resultado de um único experimento.

6.5 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPs EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA

Além da análise da modulação da expressão dos diferentes transcritos correspondentes às MMPs, foi determinada também a atividade das enzimas proteolíticas MMP-2 e MMP-9 nas linhagens de melanoma, por meio de zimografia em gelatina (como descrito no item 5.4 da seção “Material e Métodos”). A seguir, destacamos o resultado de uma zimografia na qual foi possível a inclusão de todas as linhagens utilizadas neste estudo. Neste zimograma não foi obtida separação

adequada entre pró-formas e formas ativas das MMPs. Portanto, o zimograma resultante deste experimento, apresentado na figura 19, é apenas qualitativo.

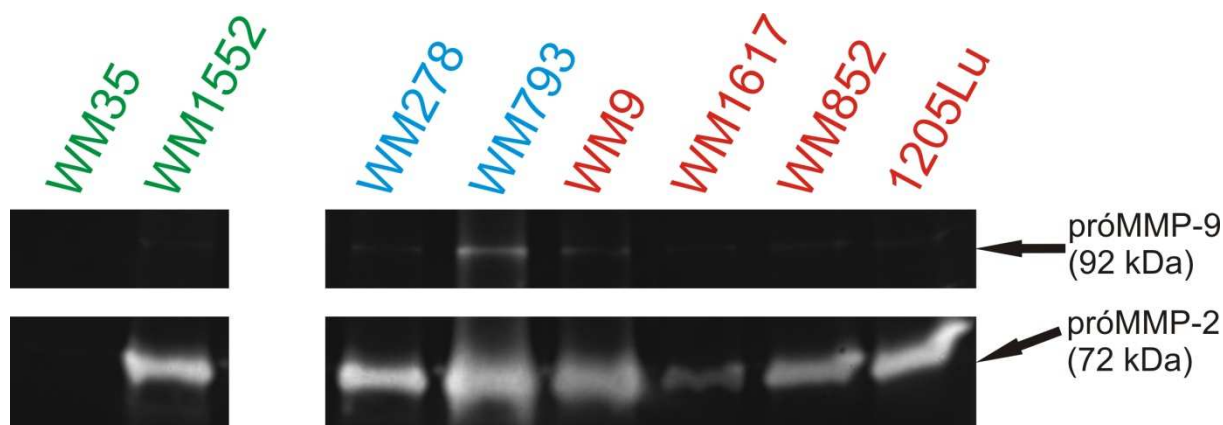


FIGURA 19 – ZIMOGRAMA EM GELATINA DE LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA (SEM SEPARAÇÃO DE PRÓ-FORMAS)

FUNTE: O Autor (2010)

NOTA: O experimento foi conduzido como descrito no item 5.4 da seção “Material e Métodos”. As bandas correspondem às gelatinases indicadas pelas setas à direita. A cor do nome das linhagens indica a fase da progressão que ela representa: verde, RGP; azul, VGP e; vermelho, metastáticas.

Neste experimento, porém, foi observado que não houve separação adequada das pró-formas das MMPs em relação à suas formas ativas.

Em uma tentativa subsequente foi possível observar as bandas referentes à pró-MMP-2 (72kDa) e MMP-2 ativa (68kDa). Porém neste ensaio não foi possível incluir as linhagens WM278 (VGP) ou a WM852 (metastática). A figura 20 mostra o zimograma obtido deste experimento (figura 20A), juntamente com as quantificações realizadas por densitometria (figura 20B e 20C).

Observa-se que a linhagem WM793 possui uma quantidade grande de MMP-2 total, o que está de acordo com a grande quantidade obtida do mRNA para esta *MMP* observada nesta linhagem (figura 14). A mesma correlação entre os níveis de expressão do transcrito e os níveis de atividade foi observado na linhagem WM35, que apresenta níveis baixos do transcrito de *MMP2* (figura 14), e não apresenta atividade de gelatinases em níveis detectáveis por zimografia (figura 19 e 20). Numa análise qualitativa, o perfil da atividade de MMPs entre as linhagens está de acordo com o que foi observado na análise de expressão dos transcritos (figura 20B).

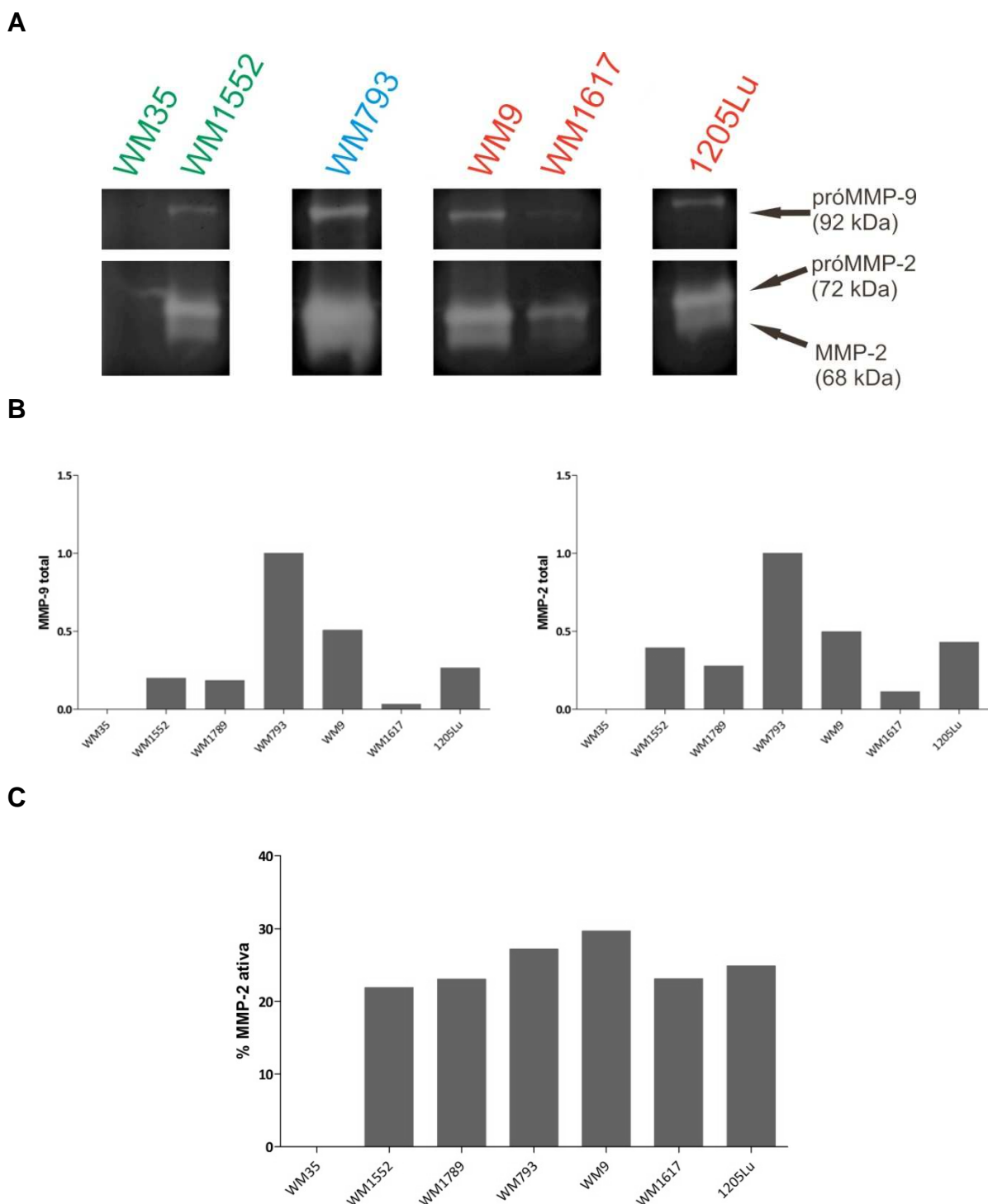


FIGURA 20 – ZIMOGRAMA EM GELATINA DE LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO QUE CARACTERIZAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO MALIGNA
 FONTE: O Autor (2010)

NOTA: O experimento foi conduzido como descrito no item 5.4 da seção “Material e Métodos”. Estes resultados são relativos à um único experimento no qual houve separação da pró-MMP-2 e MMP-2 ativas. **A**, Zimograma obtido das linhagens de melanoma. As bandas correspondem às gelatinases indicadas pelas setas à direita. A cor do nome das linhagens indica a fase da progressão que ela representa: verde, RGP; azul, VGP e; vermelho, metastáticas; **B**, Quantificação da atividade de MMP-9 e de MMP-2 total; **C**, Quantificação da forma ativa de MMP-2 em relação à atividade total no zimograma. As barras de **B** e **C** indicam a média e o desvio padrão de duas replicatas técnicas de um único experimento. As linhagens WM278 e WM852 não puderam ser incluídas neste experimento.

Em relação aos níveis obtidos de MMP2 ativa não se observa variação entre as diferentes linhagens analisadas neste estudo, excetuando-se a linhagem WM35 (linhagem RGP), que não apresentou atividade de MMPs detectável (figura 20C). É importante ressaltar que estes dados de quantificação são referentes à uma única replicata biológica, realizada em duplicata técnica.

É interessante porém, destacar que esse resultado obtido com a linhagem WM35 é bastante interessante, já que esta é uma linhagem derivada de uma lesão de baixo grau e não apresenta níveis detectáveis nem de MMP2, nem de MMP9 (figuras 19 e 20).

7 DISCUSSÃO FINAL

O melanoma é um tipo agressivo de câncer de pele, principalmente devido à sua tendência de formar metástases (CLARK *et al.*, 1984; revisado por MILLER e MIHM, 2006). Diversos trabalhos correlacionam esta tendência com os níveis das enzimas proteolíticas MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (revisado por HOFMANN *et al.*, 2000). RECK é descrito como inibidor destas metaloproteinases, e vários trabalhos demonstram que *RECK* encontra-se menos expresso em diversas neoplasias (revisado por NODA e TAKAHASHI, 2007). O gene *RECK* é regulado por efetores da cascata de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK (SASAHARA *et al.*, 1999a, 1999b e 2002), e mutações que provocam ativação constitutiva nas quinases desta via estão entre as mais frequentes em melanoma (DAVIES *et al.*, 2002). Apesar disso, até o presente momento não há dados na literatura sobre a expressão de *RECK* em melanomas. Também não há trabalhos publicados que descrevam o papel de diferentes isoformas do transcrito do gene *RECK*, resultantes de eventos alternativos de *splicing*.

Neste trabalho, portanto, foram caracterizados pela primeira vez os perfis de expressão de diferentes transcritos alternativos do gene *RECK*, tanto da forma canônica quanto de três de suas isoformas alternativas de *splicing*. Também foram analisados os níveis dos transcritos de *MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP* e de *TIMP1* e *TIMP2*, em diferentes linhagens de melanoma humano que procuram representar o contexto da progressão do melanoma por estágios sucessivos de capacidade invasiva. Nosso painel de análise consistiu de oito linhagens de melanoma humano, divididas em três grupos de acordo com as características da lesão da qual foram originadas. Os estágios de progressão maligna são aqueles descritos por Clark *et al.* (1984): fase de crescimento radial (RGP), fase de crescimento vertical (VGP) e fase metastática (Met).

A análise da expressão dos genes mencionados no modelo descrito revelou que há uma grande variação da mesma entre as linhagens. Mesmo linhagens isoladas de lesões de mesmo grau de progressão apresentaram níveis discrepantes dos transcritos de interesse. Isso é evidenciado quando compara-se os níveis de expressão das isoformas A, B e D do transcrito de *RECK* nas linhagens metastáticas 1205Lu e WM1617 (figura 9). Dentro do mesmo grupo de linhagens (metastáticas) temos os dois extremos de expressão destes genes de todo o painel de linhagem

analisado neste estudo, com a linhagem 1205Lu exibindo os níveis de expressão mais elevados e a WM1617, os mais baixos. Este tipo de variação mostra a importância de se utilizar linhagens, ou grupos delas, que sejam representativas das populações que se deseja analisar, e chama a atenção para os possíveis enganos que possam ser induzidos quando se compara duas linhagens celulares isoladamente.

Neste modelo de progressão de melanoma as diferentes linhagens foram agrupadas de acordo com o estágio de progressão da lesão da qual foram isoladas. A expressão dos genes de interesse foi examinada em cada linhagem e as médias de expressão obtidas de cada grupo foram comparadas. Não foi observada modulação significativa da expressão de nenhum gene isoladamente entre os grupos de linhagens RGP, VGP e Metastáticas.

Este modelo contempla duas linhagens metastáticas derivadas de lesões primárias do tipo VGP, as quais também geraram linhagens celulares que estão disponíveis no nosso painel de estudo: linhagem metastática WM1617 derivada da linhagem VGP - WM278 e linhagem metastática 1205Lu derivada da linhagem VGP – WM793 (HSU, ELDER e HERLYN, 1998). O fato de termos conhecimento prévio de que essas linhagens metastáticas derivam de suas respectivas parceiras VGP e termos conhecimento das condições micro-ambientais que levaram à progressão maligna das mesmas, torna interessante o estudo das modulações dos genes de interesse para este trabalho nesses pares individuais de linhagens.

Foi verificado que no par de linhagens WM278/WM1617 houve uma redução significativa na expressão da forma canônica do transcrito de *RECK* na linhagem metastática ($p=0,0320$) (figura 9), o que está de acordo com o comportamento de *RECK* descrito até o momento para diferentes tipos de tumores (FURUMOTO *et al.*, 2001; RABIEN *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2007; revisado por NODA e TAKAHASHI, 2007). De forma interessante, a redução da expressão de *RECK* canônico na linhagem WM1617 foi acompanhada de aumento significativo de expressão de *MT1MMP* ($p=0.0013$) (figura 15) e *TIMP2* ($p=0.0456$) (figura 13). É importante ressaltar nesse momento que as proteínas MT1-MMP e TIMP-2 fazem parte de um complexo ternário, localizado na membrana plasmática das células juntamente com a pró-MMP-2, que medeia a conversão do pro-peptídeo de MMP-2 em sua forma ativa (STRONGIN *et al.*, 1995; BUTLER *et al.*, 1998; STRONGIN *et al.*, 2001). Nossos dados permitem a sugestão de que na progressão maligna observada no

par de linhagens WM278/WM1617 o aumento da expressão de dois componentes desse complexo (*TIMP2* e *MT1MMP*), juntamente com a redução dos níveis de expressão do inibidor RECK estariam levando à maior ativação de MMP-2 na linhagem metastática. Esta sugestão está de acordo com o que foi observado por Hofmann *et al.* (1999), em experimentos de implante xenográfico *in vivo* utilizando modelo murino, onde os tumores derivados de linhagens mais metastáticas apresentaram um aumento significativo da atividade proteolítica de MMP-2. Para confirmar ou não essa hipótese devem ser avaliados os níveis de MMP-2 ativa no par de linhagens WM278/WM1617. Neste trabalho não foi possível incluir a linhagem WM278 no zimograma cuja separação satisfatória da pró-forma e forma ativa de MMP-2 foi atingida (figura 20).

De forma contraditória, no outro par de linhagens WM793/1205Lu, o comportamento observado na modulação de expressão dos genes de interesse foi exatamente o oposto. A linhagem metastática 1205Lu apresenta expressão significativamente maior da forma canônica do transcrito de *RECK* do que a linhagem que lhe deu origem, WM793 ($p=0,0089$). Este aumento na expressão de *RECK* canônico foi concomitante com a redução significativa da expressão dos transcritos de *MT1MMP* ($p=0,0011$) (figura 15) e *TIMP2* ($p=0,05$) (figura 13). Quando analisamos os ensaios de atividade realizados para MMP-2, por zimografia de gelatina, e avaliamos os níveis dessa enzima ativa (figura 20A e 20C) não observamos diferença entre as linhagens WM793 e 1205Lu. Devemos destacar, porém, que justamente a linhagem WM793 é a que apresenta os maiores níveis de MMP-2 (tanto da forma ativa como da pró-forma dessa enzima) em comparação com todo o painel de linhagens analisado neste estudo (figuras 19 e 20). Além disso, esse ensaio de zimografia necessita de um maior número de repetições para confirmação desse resultado.

Ainda, a discrepância entre os perfis observados dos dois pares de linhagens (WM278/WM1617 e WM793/1205Lu) pode ser decorrente das diferentes naturezas dos processos de metástase que deram origem à cada uma das linhagens. Tanto a linhagem obtida da lesão primária WM278 quanto a da sua correspondente metastática WM1617 foram extraídas de lesões do mesmo paciente. Já a linhagem primária WM793 não gerou metástases no paciente do qual foi isolada. A linhagem 1205Lu foi isolada de uma metástase coletada do pulmão de um camundongo imunodeficiente, quando células da linhagem WM793 foram injetadas

na veia caudal desse animal (HSU, ELDER e HERLYN, 1998). Portanto os contextos em que se encontravam ambas as linhagens VGP quando adquiriram a capacidade metastática eram bastante distintos, e esta pode ter sido a origem da divergência entre estas duas linhagens metastáticas.

As análises relativas das razões entre os níveis de expressão de cada uma das formas alternativas de *RECK*/forma canônica permitiu a observação de que a abundância média de todas as isoformas alternativas de *RECK*, relativa à isoforma canônica, encontra-se em torno dos 50%, com algumas linhagens apresentando níveis equiparáveis ou maiores que os níveis de expressão da forma canônica (figura 11). Dados recentes de Lima *et al.* mostram que em amostras teciduais obtidas de pacientes com gliomas a abundância das isoformas alternativas de *RECK* foi cerca de 10% da abundância da canônica (dados não publicados). A abundância dos transcritos alternativos de *RECK* em diferentes tipos de tumores é uma observação importante, pois estudos publicados até o momento, que relacionam a modulação da expressão gênica de *RECK* com a sua atividade, não levam em conta o fato de que até mais de 50% do transcrito primário pode dar origem à outros mRNAs que não o canônico.

De forma muito interessante, nossos dados mostram o aumento significativo na razão isoforma B/isoforma A (canônica) de *RECK* no grupo de linhagens metastáticas em relação ao grupo composto por linhagens RGP e VGP ($p=0,0367$) (figura 12). Isto indica que a relação entre os níveis destes dois transcritos pode ter um reflexo na progressão tumoral. Esta observação se confirmou, ainda, quando analisamos o par de linhagens correlatas WM278/WM1617, onde a linhagem metastática WM1617 apresentou níveis significativamente maiores dessa razão isoforma B/isoforma A ($p=0,0435$). Já no par de linhagens WM793/1205Lu não foram detectadas diferenças significativas em relação à modulação de expressão da razão isoforma B/isoforma A de *RECK*, provavelmente pelos mesmos motivos que originaram as discrepâncias expostas anteriormente.

O aumento da expressão relativa entre a razão isoforma B/isoforma A de *RECK* em linhagens metastáticas de melanoma humano não pode ser correlacionado diretamente ao que vem sendo observado por Lima *et al.* (dados não publicados) em linhagens de glioma humano. Estes autores observaram, porém, que tanto em linhagens celulares como em amostras teciduais de pacientes com gliomas os níveis da isoforma D de *RECK* foram significativamente aumentados durante a

progressão para fases mais agressivas deste tipo de tumor. No presente trabalho, em modelo de melanoma humano, não foram verificadas alterações na expressão da isoforma D.

Vale destacar aqui que a modulação diferencial dos eventos de *splicing* durante a progressão tumoral, e a importância dos seus efeitos sobre o proteoma, vêm sendo descritas para diversos genes, como o da *Bcl-2* (revisado por SREBROW e KORNBLIHTT, 2006; PETTIGREW e BROWN, 2008; PIO e MONTUENGA, 2009). O favorecimento da formação da isoforma B de *RECK* em linhagens de melanoma metastáticos, em comparação com a forma canônica, sugere um possível papel pró-tumoral (ou mesmo pró-metastático) para esta isoforma. Esta hipótese está de acordo com dados obtidos no nosso laboratório por BARBOSA *et al.* (não publicados), que mostram que a sinvastatina, uma droga com efeitos anti-tumorais, reduz significativamente os níveis expressos da isoforma B de *RECK* (levando à uma diminuição significativa da razão isoforma B/isoforma A de *RECK*) com concomitante tendência na redução dos níveis dos mRNAs de *MMP2*, *MMP9* e *MT1MMP*.

A proteína predita à partir da sequência codificada pela isoforma B de *RECK* indica a perda dos domínios SPI (inibidor de serina proteases), envolvidos na inibição de MMPs, presentes na forma canônica da proteína. Porém, esta isoforma alternativa também possui o sinal para o ancoramento à membrana citoplasmática através da modificação GPI (ver figura 8). Este conjunto de dados, e a observação de Omura *et al.* (2009) de que a proteína *RECK* canônica forma homodímeros na superfície celular, pode indicar que a proteína codificada pela isoforma B de *RECK* pode estar, de alguma forma, competindo com a forma canônica na superfície da célula e de certa forma contribuindo para a diminuição da ação efetiva de *RECK* canônico.

Dados disponíveis sobre a eficiência na formação de colônias em ágar (EFC) das diferentes linhagens utilizadas neste estudo estão disponíveis (ver Tabela 1, item 5.1 da seção “Material e Métodos”), e os mesmos representam uma medida indireta do parâmetro de “agressividade” de cada linhagem. (HSU, ELDER e HERLYN, 1998). Esses dados mostram que a linhagem mais agressiva do nosso painel é a WM9, com uma EFC de ~32%. Esta linhagem possui níveis elevados do mRNA correspondente ao gene *MMP2*, concomitante com elevada atividade total no zimograma (ver figuras 15 (mRNA) e 19 (zimograma)). De forma semelhante, as

linhagens metastáticas WM852 e 1205Lu, com EFC de ~22% e ~25%, respectivamente, possuem níveis equivalentes de expressão de *MMP2* (menores que os observados para a WM9), enquanto a linhagem RGP WM1552, cuja EFC foi determinada como sendo 8,3% possui expressão de *MMP2* proporcionalmente menor que as linhagens WM852 e 1205Lu (ver figura 15). É interessante notar que a linhagem RGP WM35 apresenta uma EFC de aproximadamente 1% e esta linhagem possui níveis extremamente baixos do transcrito de *MMP2* (figura 15), e não apresenta atividade detectável no zimograma (figura 19). Assim, com exceção da linhagem WM793, o perfil geral de expressão e atividade de MMPs que foi observado em nosso modelo está razoavelmente de acordo com o que está descrito na literatura, onde linhagens de melanoma mais agressivas apresentam maior expressão de *MMP2 in vitro* (HOFMANN *et al.*, 1999).

Em um trabalho onde foi utilizado o mesmo painel de linhagens analisadas neste estudo, Sousa e Spreafico (2008) conduziram uma série de análises para determinar, dentre WM35 e WM1552, qual linhagem representava melhor as características da fase de crescimento radial. WM1552 foi descrita como sendo mais adequada, devido principalmente à ausência de marcadores moleculares de melanomas avançados, como a integrina $\alpha_v\beta_3$, e à incapacidade de gerar lesões em camundongos imunodeficientes. Em nosso estudo, porém, verificamos que a linhagem WM35 apresenta níveis significativamente mais elevados da forma canônica de *RECK* ($p=0,034$) (figura 9) e de *TIMP2* ($p=0,0010$) (figura 13) em relação à WM1552, enquanto apresenta níveis ínfimos de *MMP2* (figura 15), com atividade indetectável no zimograma realizado (figura 19). A EFC da linhagem WM35 é de cerca de 1%, valor bem abaixo do obtido para a linhagem WM1552 – de 8,3% (ver tabela 1, item 5.1 da seção “Material e Métodos”) (HSU, ELDER e HERLYN, 1998). Estas características estão de acordo com as de uma linhagem menos agressiva, de acordo com os parâmetros descritos por Hofmann *et al.* (1999) e Valente *et al.* (1998).

Uma possível explicação para a baixa expressão de *MMP2* na linhagem RGP WM35 reside no fato de que esta linhagem foi descrita como possuindo níveis baixos do fator de transcrição STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) na sua forma ativa (fosforilada) (OKA *et al.*, 2009). Este fator de transcrição tem papel importante na expressão de *MMP2* (CLARK *et al.*, 2008).

O transcrito de *MMP9* encontra-se em níveis menores que os de *MMP2* em sete das oito linhagens avaliadas, e houve redução significativa tanto na progressão de WM278 para a metástase WM1617 ($p=0,0044$) quanto na progressão de WM793 para 1205Lu ($p=0,0048$) (figura 15). Estes dados de expressão gênica correlacionam com o que foi observado *in vivo* por van der Oord *et al.* (1997), que verificou através de imunohistoquímica que havia quantidades moderadas de MMP-9 em melanomas de crescimento vertical e não detectou a proteína em melanomas metastáticos.

Macdougall *et al.* (1999), demonstraram que diferentes linhagens com maior capacidade de invasão possuem uma razão entre os transcritos de *TIMP1/MMP9* menor, e postulou que a capacidade invasiva depende do balanço entre MMPs e seus inibidores. Em nosso modelo, porém, não observamos alteração em nenhuma das razões entre transcritos de inibidor/MMP entre os grupos RGP, VGP e metastático. No estudo citado, os autores utilizaram amostras teciduais obtidas de pacientes, e não linhagens imortalizadas, como no nosso modelo. Os perfis observados nas linhagens de melanoma utilizadas neste estudo devem ser interpretados considerando que tais linhagens foram cultivadas sobre um substrato de plástico, e que a expressão descrita aqui para os genes avaliados refere-se à esta condição. É importante ressaltar que a progressão do melanoma envolve a expressão diferencial de moléculas de adesão célula-MEC, como a integrina $\alpha_v\beta_3$ (SEFTOR *et al.*, 1993; BROOKS *et al.*, 1996), e portanto, é possível que respostas distintas relativas à expressão dos genes de interesse nesse estudo sejam obtidas entre os grupos RGP, VGP e metastático utilizando-se o estímulo do contato das células de melanoma com componentes de matriz extracelular. O cultivo destas linhagens em modelo de esferóides implantados sob matriz de colágeno (SMALLEY, LIONI e HERLYN, 2006) seria uma perspectiva interessante de ampliação deste trabalho.

8 CONCLUSÕES

Tanto a forma canônica do transcrito do gene *RECK* quanto as isoformas resultantes de *splicing* alternativo estão presentes em níveis detectáveis nas linhagens de melanoma analisadas. Neste trabalho, os níveis dos transcritos do gene *RECK* foram quantificados pela primeira vez em linhagens derivadas de melanomas.

Ocorre uma razão isoforma B/isoforma canônica do transcrito de *RECK* mais elevada em linhagens derivadas de lesões metastáticas do que nas derivadas de tumores primários, o que sugere que o gene *RECK* pode possuir um papel dual na progressão tumoral, que será determinado de acordo com a combinação de eventos de *splicing* alternativo a que o transcrito primário está submetido.

A relação entre os níveis dos mRNAs analisados neste trabalho e as fases da progressão do melanoma não é clara quando observa-se todas as linhagens analisadas em conjunto. Entretanto, quando observados isoladamente, pares específicos de linhagens (WM278/WM1617 e WM793/1205Lu) apresentaram modulação na expressão de vários genes. No par WM278/WM1617 ocorrem alterações na expressão de *MT1MMP*, *TIMP2* e *RECKA* (canônico) no sentido de aumentar a capacidade de ativação da pró-MMP-2, enquanto no par WM793/1205Lu estas alterações ocorrem no sentido oposto.

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo mostram que o gene *RECK* possui papel importante no melanoma, e que as moléculas classicamente reguladas pela glicoproteína são expressas de forma diferenciada ao longo da progressão tumoral.

REFERÊNCIAS

ACCORSI-MENDONÇA, T. *et al.* Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **J Mol Histol**, v. 39, n. 2, p. 201-8, Apr 2008.

ALBELDA, S. M. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. **Lab Invest**, v. 68, n. 1, p. 4-17, Jan 1993.

ALBELDA, S. M. *et al.* Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. **Cancer Res**, v. 50, n. 20, p. 6757-64, Oct 15 1990.

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 5 ed. New York: Garland Science. 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/lrn/lrn_0.asp> Acesso em: 12/1/2010.

BASBAUM, C. B., WERB, Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. **Curr Opin Cell Biol**, v. 8, n. 5, p. 731-8, Oct 1996.

BERG, K. D. *et al.* Caveolae in fibroblast-like synoviocytes: static structures associated with vimentin-based intermediate filaments. **Histochem Cell Biol**, v. 131, n. 1, p. 103-14, Jan 2009.

BODE, W. *et al.* Insights into MMP-TIMP interactions. **Ann N Y Acad Sci**, v. 878, p. 73-91, Jun 30 1999a.

BODE, W. *et al.* Structural properties of matrix metalloproteinases. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, n. 4, p. 639-52, Apr 1999b.

BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 267-83, Mar 7 2000.

BROOKS, P. C. *et al.* Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 683-93, May 31 1996.

BUSTIN, S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, p. 169 - 193, 2000.

BUTLER, G. S. *et al.* The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. **J Biol Chem**, v. 273, n. 2, p. 871-80, Jan 9 1998.

CHAKRABORTI, S. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol Cell Biochem**, v. 253, n. 1-2, p. 269-85, Nov 2003.

CHANG, C. K., HUNG, W. C., CHANG, H. C. The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo. **J Cell Mol Med**, Jan 11 2008.

CHANG, H. C., CHO, C. Y., HUNG, W. C. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. **Cancer Sci**, v. 98, n. 2, p. 169-73, Feb 2007.

CHANG, H. C., CHO, C. Y., HUNG, W. C. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. **Cancer Res**, v. 66, n. 17, p. 8413-20, Sep 1 2006.

CHANG, H. C., LIU, L. T., HUNG, W. C. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. **Cell Signal**, v. 16, n. 6, p. 675-9, Jun 2004.

CHO, C. Y. *et al.* Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 1, p. 65-9, Oct 2007.

CLARK, I. M. *et al.* The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 6-7, p. 1362-78, 2008.

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

CLARK, W. H., JR. *et al.* A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol**, v. 15, n. 12, p. 1147-65, Dec 1984.

CORREA, T. C. *et al.* Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 1, p. 156-67, Sep 1 2006.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **N Engl J Med**, v. 358, n. 5, p. 502-11, Jan 31 2008.

CROWSON, A. N. *et al.* The molecular basis of melanomagenesis and the metastatic phenotype. **Semin Oncol**, v. 34, n. 6, p. 476-90, Dec 2007.

DAHL, C., GULDBERG, P. The genome and epigenome of malignant melanoma. **Apmis**, v. 115, n. 10, p. 1161-76, Oct 2007.

DANCEY, J. E. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. **Cancer Biol Ther**, v. 5, n. 9, p. 1065-73, Sep 2006.

DANEN, E. H. *et al.* Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. **Histopathology**, v. 24, n. 3, p. 249-56, Mar 1994.

DAVIES, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-54, Jun 27 2002.

DERYUGINA, E. I., QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 1, p. 9-34, Mar 2006.

DERYUGINA, E. I. *et al.* MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. **Exp Cell Res**, v. 263, n. 2, p. 209-23, Feb 15 2001.

ECHIZENYA, M. *et al.* The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. **Oncogene**, v. 24, n. 38, p. 5850-7, Sep 1 2005.

EGEBLAD, M., WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-74, Mar 2002.

FIGUEIRA, R. C. *et al.* Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 20, Jan 14 2009.

FINGLETON, B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. **Front Biosci**, v. 11, p. 479-91, 2006.

FLORES, J. F. *et al.* Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. **Cancer Res**, v. 56, n. 21, p. 5023-32, Nov 1 1996.

FRIEDL, P., WOLF, K. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. **Cancer Res**, v. 68, n. 18, p. 7247-9, Sep 15 2008.

FURUMOTO, K. *et al.* RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology**, v. 33, n. 1, p. 189-95, Jan 2001.

GABRIELY, G. *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 17, p. 5369-80, Sep 2008.

GILCHREST, B. A. *et al.* The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med**, v. 340, n. 17, p. 1341-8, Apr 29 1999.

GOMEZ, D. E. *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **Eur J Cell Biol**, v. 74, n. 2, p. 111-22, Oct 1997.

GRAY-SCHOPFER, V., WELLBROCK, C., MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, Feb 22 2007.

HAASS, N. K. *et al.* Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 18, n. 3, p. 150-9, Jun 2005.

HATTA, M. *et al.* Density- and serum-dependent regulation of the Reck tumor suppressor in mouse embryo fibroblasts. **Cell Signal**, v. 21, n. 12, p. 1885-93, Dec 2009.

HEID, C. *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6, p. 986 - 994, 1996.

HERLYN, M. *et al.* Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. **Cancer Res**, v. 45, n. 11 Pt 2, p. 5670-6, Nov 1985.

HESLING, C. *et al.* In vivo and in situ modulation of the expression of genes involved in metastasis and angiogenesis in a patient treated with topical imiquimod for melanoma skin metastases. **Br J Dermatol**, v. 150, n. 4, p. 761-7, Apr 2004.

HOFMANN, U. B. *et al.* Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochimie**, v. 87, n. 3-4, p. 307-314, 2005.

HOFMANN, U. B. *et al.* Expression of integrin alpha(v)beta(3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. **Int J Cancer**, v. 87, n. 1, p. 12-9, Jul 1 2000a.

HOFMANN, U. B. *et al.* Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. v. 115, n. 3, p. 337-344, 2000b.

HOFMANN, U. B. *et al.* Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. **J Pathol**, v. 191, n. 3, p. 245-56, Jul 2000c.

HOFMANN, U. B. *et al.* Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. **Br J Cancer**, v. 81, n. 5, p. 774-82, Nov 1999.

HOU, C., ZHANG, Y. Expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: links to disease activity, damage accrual and matrix metalloproteinase 9 secretion. **J Int Med Res**, v. 36, n. 4, p. 704-13, Jul-Aug 2008.

HSU, M. *et al.* Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 9), p. 1535-42, May 2000.

HSU, M. C., CHANG, H. C., HUNG, W. C. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion. **J Biol Chem**, v. 281, n. 8, p. 4718-25, Feb 24 2006.

HSU, M. Y. *et al.* E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1515-25, May 2000.

HSU, M. Y., ELDER, D. E., HERLYN, M. Melanoma: The Wistar Melanoma Cell Lines. In: MASTERS, J. R. W., PALSSON, B (Ed.). **Cancer Cell Lines**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 259-274.

IIDA, J. *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 1, p. 167-76, Jan 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 12/1/2010.

ITOH, T. *et al.* Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. **Clin Exp Metastasis**, v. 17, n. 2, p. 177-81, Mar 1999.

KANG, H. G. *et al.* RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. **J Orthop Res**, v. 25, n. 5, p. 696-702, May 2007.

KUMAMOTO, H., OOYA, K. Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 6, p. 345-51, Jul 2006.

LASKOWSKI, M., JR., KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu Rev Biochem**, v. 49, p. 593-626, 1980.

LI, S. L. *et al.* Correlation of matrix metalloproteinase suppressor genes RECK, VEGF, and CD105 with angiogenesis and biological behavior in esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 45, p. 6076-81, Dec 7 2007.

LI, Y., ZHANG, Y., ZHENG, Q. Expression of RECK gene and MMP-9 in hilar cholangiocarcinoma and its clinical significance. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 25, n. 5, p. 552-4, 2005.

LIU, L. T. *et al.* Induction of RECK by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in lung cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 54, p. 8347-50, Nov 28 2002.

LIU, L. T. *et al.* Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. **Cancer Res**, v. 63, n. 12, p. 3069-72, Jun 15 2003a.

LIU, L. T. *et al.* RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. **Oncogene**, v. 22, n. 51, p. 8263-70, Nov 13 2003b.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LONG, N. K. *et al.* Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, May 14 2008.

MACDOUGALL, J. R. *et al.* 'Proteolytic switching': opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. **Br J Cancer**, v. 80, n. 3-4, p. 504-12, May 1999.

MACDOUGALL, J. R. *et al.* The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. **Cancer Res**, v. 55, n. 18, p. 4174-81, Sep 15 1995.

MASUI, T. *et al.* RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 5, p. 1779-84, May 2003.

MENG, N. *et al.* RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histol Histopathol**, v. 23, n. 8, p. 1003-10, Aug 2008.

MIKI, T. *et al.* The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. **J Biol Chem**, v. 282, n. 16, p. 12341-52, Apr 20 2007.

MILLER, A. J., MIHM, M. C., JR. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, Jul 6 2006.

MONTGOMERY, A. M. *et al.* Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways. **Cancer Res**, v. 53, n. 3, p. 693-700, Feb 1 1993.

MONTGOMERY, A. M. *et al.* Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. **Cancer Res**, v. 54, n. 20, p. 5467-73, Oct 15 1994.

MORIOKA, Y. *et al.* The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. **Oncogene**, Jan 26 2009.

MURPHY, G., KNAUPER, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? **Matrix Biol**, v. 15, n. 8-9, p. 511-8, Mar 1997.

NAGASE, H., VISSE, R., MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562 - 573, 2006.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol Chem**, v. 378, n. 3-4, p. 151-60, Mar-Apr 1997.

NAGASE, H., WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 274, n. 31, p. 21491-4, Jul 30 1999.

NAKAHARA, H. *et al.* Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 15, p. 7959-64, Jul 22 1997.

NATIONAL INSTITUTE OF CANCER. Disponível em: <www.cancer.gov>. Acesso em: 20/11/2009.

NODA, M. *et al.* RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev**, v. 22, n. 2-3, p. 167-75, Jun-Sep 2003.

NODA, M., TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. **Cancer Sci**, v. 98, n. 11, p. 1659-65, Nov 2007.

OH, J. *et al.* TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. **Oncogene**, v. 25, n. 30, p. 4230-4, Jul 13 2006.

OH, J. *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. **Cancer Res**, v. 64, n. 24, p. 9062-9, Dec 15 2004.

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. 789-800, Dec 14 2001.

OHL, F. *et al.* Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? **J Mol Med**, v. 83, n. 12, p. 1014-24, Dec 2005.

OKA, M. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 upregulates interleukin-8 expression at the level of transcription in human melanoma cells. **Exp Dermatol**, Sep 16 2009.

OMURA, A. *et al.* RECK Forms Cowbell-shaped Dimers and Inhibits Matrix Metalloproteinase-catalyzed Cleavage of Fibronectin. **J Biol Chem**, v. 284, n. 6, p. 3461-9, Feb 6 2009.

OSHIMA, T. *et al.* Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinases and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in patients with colorectal cancer: MMP-2 gene expression is a useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer. **Oncol Rep**, v. 19, n. 5, p. 1285-91, May 2008.

PESTA, M. *et al.* Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC. **Anticancer Res**, v. 29, n. 11, p. 4535-9, Nov 2009.

PETITCLERC, E. *et al.* Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. **Cancer Res**, v. 59, n. 11, p. 2724-30, Jun 1 1999.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.

PIO, R., MONTUENGA, L. M. Alternative splicing in lung cancer. **J Thorac Oncol**, v. 4, n. 6, p. 674-8, Jun 2009.

POMERANTZ, J. *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 713-23, Mar 20 1998.

POUST, J. Targeting metastatic melanoma. **Am J Health Syst Pharm**, v. 65, n. 24 Suppl 9, p. S9-S15, Dec 15 2008.

RABIEN, A. *et al.* Decreased RECK expression indicating proteolytic imbalance in prostate cancer is associated with higher tumor aggressiveness and risk of prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy. **Eur Urol**, v. 51, n. 5, p. 1259-66, May 2007.

RHEE, J. S., COUSSENS, L. M. RECKing MMP function: implications for cancer development. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 5, p. 209-11, May 2002.

RUSSO, A. E. *et al.* Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). **Int J Oncol**, v. 34, n. 6, p. 1481-9, Jun 2009.

SASAHARA, R. M. *et al.* Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detect Prev**, v. 26, n. 6, p. 435-43, 2002.

SASAHARA, R. M., TAKAHASHI, C., NODA, M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 264, n. 3, p. 668-75, Nov 2 1999a.

SASAHARA, R. M. *et al.* Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 7, p. 891-5, Jul 1999b.

SATYAMOORTHY, K. *et al.* Melanoma cell lines from different stages of progression and their biological and molecular analyses. **Melanoma Res**, v. 7 Suppl 2, p. S35-42, Aug 1997.

SCHMITTGEN, T. D., LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008.

SEFTOR, R. E. B. *et al.* The 72 kDa Type IV Collagenase Is Modulated via Differential Expression of $\alpha_3\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ Integrins during Human Melanoma Cell Invasion. **Cancer Res**, v. 53, n. 14, p. 3411-3415, July 15, 1993 1993.

SEKULIC, A. *et al.* Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. **Mayo Clin Proc**, v. 83, n. 7, p. 825-46, Jul 2008.

SIMIZU, S. *et al.* RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. **Cancer Res**, v. 65, n. 16, p. 7455-61, Aug 15 2005.

SKARDA, J., AMARIGLIO, N., REHAVI, G. RNA editing in human cancer: review. **Apmis**, v. 117, n. 8, p. 551-7, Aug 2009.

SMALLEY, K. S., LIONI, M., HERLYN, M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 42, n. 8-9, p. 242-7, Sep-Oct 2006.

SMALLEY, K. S., EISEN, T. G. Farnesyl transferase inhibitor SCH66336 is cytostatic, pro-apoptotic and enhances chemosensitivity to cisplatin in melanoma cells. **Int J Cancer**, v. 105, n. 2, p. 165-75, Jun 10 2003.

SMALLEY, K. S. *et al.* Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 5, p. 1136-44, May 2006.

SONG, S. Y. *et al.* Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 1, p. 101-8, Jan 2006.

SOUNNI, N. E., NOEL, A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. **Biochimie**, v. 87, n. 3-4, p. 329-42, Mar-Apr 2005.

SOUSA, J. F., ESPREAFICO, E. M. Suppression subtractive hybridization profiles of radial growth phase and metastatic melanoma cell lines reveal novel potential targets. **BMC Cancer**, v. 8, p. 19, 2008.

SPAN, P. N. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 11, p. 2710-5, Jun 1 2003.

SPRINGMAN, E. B. *et al.* Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 1, p. 364-8, Jan 1990.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol**, v. 200, n. 4, p. 448-64, Jul 2003.

STETLER-STEVENSON, W. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. **Sci Signal**, v. 1, n. 27, p. re6, 2008.

STETLER-STEVENSON, W. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Cancer Metastasis Rev**, v. 27, n. 1, p. 57 - 66, 2008.

STETLER-STEVENSON, W. G. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 9, n. 4, p. 289-303, Dec 1990.

STRONGIN, A. Mislocalization and unconventional functions of cellular MMPs in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 1, p. 87 - 98, 2006.

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. 270, n. 10, p. 5331-8, Mar 10 1995.

SUZUKI, T., HIGGINS, P., CRAWFORD, D. Control selection for RNA quantitation. **Biotechniques**, v. 29, p. 332 - 337, 2000.

TAKAGI, S. *et al.* Expression of membrane-anchored matrix metalloproteinase inhibitor reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs in murine cell lines. **Exp Oncol**, v. 29, n. 1, p. 30-4, Mar 2007.

TAKAGI, S. *et al.* Molecular cloning of canine membrane-anchored inhibitor of matrix metalloproteinase, RECK. **J Vet Med Sci**, v. 67, n. 4, p. 385-91, Apr 2005.

TAKAGI, S., SIMIZU, S., OSADA, H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. **Cancer Res**, v. 69, n. 4, p. 1502-8, Feb 15 2009.

TAKAHASHI, C. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 22, p. 13221-6, Oct 27 1998.

TAKEMOTO, N. *et al.* Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 58, n. 3, p. 376-83, Dec 2007.

TAKENAKA, K. *et al.* Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 10, p. 1617-23, Jul 2004.

TAKENAKA, K. *et al.* Prognostic significance of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs expression in resected pathologic stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer. **Ann Surg Oncol**, v. 12, n. 10, p. 817-24, Oct 2005.

TAKEUCHI, T. *et al.* The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 16, p. 5572-9, Aug 15 2004.

TARHINI, A. A., AGARWALA, S. S. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. **Dermatol Ther**, v. 19, n. 1, p. 19-25, Jan-Feb 2006.

TSAI, J. *et al.* Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 8, p. 3041-6, Feb 26 2008.

TSAO, H. *et al.* Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 2, p. 337-41, Feb 2004.

VAGIMA, Y. *et al.* MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. **J Clin Invest**, Feb 9 2009.

VALENTE, P. *et al.* TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. **Int J Cancer**, v. 75, n. 2, p. 246-53, Jan 19 1998.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1 - research0034.11, 2002.

VAN DER JAGT, M. F. *et al.* Correlation of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer. **Cancer Lett**, v. 237, n. 2, p. 289-97, Jun 18 2006.

VILLANUEVA, J., HERLYN, M. Melanoma and the tumor microenvironment. **Current Oncology Reports**, v. 10, n. 5, p. 439-446, 2008.

WARD, R. V. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblast membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1079, n. 2, p. 242-6, Aug 30 1991.

WEAVER, V. M. Membrane-associated MMP regulators: novel cell adhesion tumor suppressor proteins? **Dev Cell**, v. 2, n. 1, p. 6-7, Jan 2002.

WILHELM, S. M. *et al.* BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. **Cancer Res**, v. 64, n. 19, p. 7099-109, Oct 1 2004.

WINNISCHOFER, S. M. B. **Caracterização do envolvimento do gene RECK na proliferação celular e progressão tumoral: inversa correlação com a expressão do oncogene c-myc.** Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica, Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

WISTAR INSTITUTE. Meenhard Herlyn Laboratory Website. Disponível em: <<http://www.wistar.org/herlyn/melanoma.htm>>. Acesso em: 20/11/2009.

XIE, T. X. *et al.* Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. **Oncogene**, v. 23, n. 20, p. 3550-60, Apr 29 2004.

ZHANG, Z. *et al.* miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. **Lab Invest**, v. 88, n. 12, p. 1358-66, Dec 2008.