

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DE CARVALHO NEME KENSKI

**PAPEL DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES NO
POTENCIAL ANTI-TUMORAL DA SINVASTATINA EM LINHAGENS DE GLIOMA
HUMANO**

CURITIBA

2013

JULIANA DE CARVALHO NEME KENSKI

**PAPEL DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES NO
POTENCIAL ANTI-TUMORAL DA SINVASTATINA EM LINHAGENS DE GLIOMA
HUMANO**

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

Orientadora: Prof^a Dra^a Sheila M. B. Winnischofer

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO



PAPEL DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E SEUS INIBIDORES NO POTENCIAL ANTI-TUMORAL DA SINVASTATINA EM LINHAGENS DE GLIOMA 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:

Sheila Maria Brochado Winnischofer

Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Brochado Winnischofer (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Silvia Maria Suter Correa Cadena

Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Suter Correa Cadena
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Adriana F. Mercadante

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

Curitiba, Fevereiro de 2013.

**Para a minha avó Rosy,
Meu avô Armando,
Minha mãe Lilian,
Minha tia e segunda mãe, Nancy
E para o meu tio Armando.
Cinco anjos que hoje olham juntos, por nós lá de cima...**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, aos meus anjos da guarda, e aos meus guias espirituais por terem sempre me protegido e guiado meus caminhos.

Gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio, dedicação, todo amor e educação que sempre recebi. Principalmente ao meu Pai, um guerreiro e um homem maravilhoso, que criou três pessoas íntegras e muito amadas. Aos meus dois irmãos, Gustavo e Manoela, meus amigos e companheiros para toda a vida.

À minha avó Elvira, que esse ano completa 99 anos, da qual eu sinto o maior orgulho do mundo!

Ao meu noivo Leandro, por ter ficado todas as madrugadas e finais de semana em que precisei no laboratório comigo, por estar comigo sempre que eu precisei, por ser meu amor, meu amigo e meu companheiro. Agradeço muito também a toda a família maravilhosa que ganhei junto com ele, que me acolheu de um modo sem igual.

Agradeço imensamente à minha Orientadora, Prof^a Dr^a Sheila Winnischofer, uma pessoa, uma mulher, uma mãe, e uma cientista maravilhosa. São quatro anos de convivência que não podiam ser melhores. Agradeço por todo apoio, todas as conversas, toda a paciência. Principalmente agradeço tudo que eu aprendi com você. MUITO obrigada.

Agradeço a todos os amigos do laboratório e também do departamento, aos que ainda estão por lá, e aos que já tomaram outros rumos. Muito obrigado por todas as conversas, trocas de experiências (científicas ou não), protocolos e por esses 4 anos de convivência.

Agradeço muito ao Thiago Jacomasso, meu amigo e Co-Orientador (mesmo que agora informalmente!). Esse trabalho também é seu!

Agradeço aos meus poucos e bons amigos da Biologia UFPR 2006/2, que como eu, lutam para que nossa profissão reflita toda a dedicação e tudo que aprendemos durante nosso curso.

Agradeço aos amigos da turma de mestrado: Maria Carol, Lyvia, Monique e Cristiane. Esses 2 anos de convivência foram tão intensos que não tenho dúvida nenhuma que nossa amizade durará para sempre.

As demais Professoras do grupo de Oxidações Biológica, por toda a dedicação, apoio, e por manterem tudo funcionando da melhor maneira possível!

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica).

Aos colaboradores desse trabalho, A Prof^a Dr^a Mari Cleide Sogayar do Instituto de Química da USP, por todo o suporte e pela oportunidade de participar do Curso de Biologia Molecular da Transformação Maligna, que me enriqueceu muito. À Marina Trombetta Lima, também do IQ-USP, por todo o tipo de ajuda que sempre recebi, e por ser uma das pessoas mais queridas que conheço.

Aos alunos, técnicos e professores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, pela possibilidade e auxílio no uso de alguns equipamentos.

As agências financiadoras desse projeto.

A todos que eu possa ter esquecido de mencionar, me perdoem e por favor, sintam-se devidamente agradecidos.

Agradeço muito a todos que, de forma direta ou indireta, auxiliaram na realização desse trabalho.

Meu muito obrigada.

RESUMO

Gliomas são os tumores mais comuns do sistema nervoso central, e em seu mais alto grau de malignidade (também chamado de glioblastoma multiforme – GBM) são tidos hoje como incuráveis, sendo a sobrevida nesses casos de no máximo 15 meses. Uma das principais causas da alta taxa de mortalidade é a elevada capacidade de invasão, processo realizado pelas metaloproteinasas de matriz (MMPs). As principais MMPs envolvidas na invasão de gliomas são as MMPs 2, 9 e a MT1-MMP. As MMPs são inibidas principalmente por seus inibidores tissulares solúveis (TIMPs) ou RECK, uma glicoproteína ancorada a membrana. RECK está presente principalmente em microdomínios ricos em colesterol na membrana celular (*lipid rafts*) e é capaz de inibir através de diversos mecanismos as MMPs 2, 9 e a MT1-MMP. Recentemente, foi descrito um transcrito alternativo do gene RECK (RECKB), e evidências suportam que RECKB esteja relacionado a um fenótipo maligno. Já as TIMPs (4 em humanos) são proteínas solúveis e menos específicas. O balanço negativo MMPs/Inibidores é fundamental para o controle do processo invasivo, tornando importante a busca de compostos capazes de estimular esse balanço a favor dos inibidores. As estatinas são inibidores da enzima HMG-CoA redutase, fundamental na síntese de colesterol e isoprenóides, e são hoje muito utilizadas por pacientes com hipercolesterolemia. Recentemente, alguns autores associaram o uso das estatinas a uma menor incidência em diversos tipos de tumores (inclusive gliomas), pois proteínas fundamentais para a proliferação e invasão, como Ras e Rho, necessitam de moléculas isoprenóides para ancorarem-se na parte interna da membrana e assim exercerem suas funções corretamente. Posto isso, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da sinvastatina na viabilidade, migração e parada de proliferação em linhagens de glioblastoma humano U87MG e T98G, e verificar a contribuição do balanço MMPs/Inibidores para o fenótipo anti-invasivo atribuído à sinvastatina. Primeiramente, nossos dados mostraram que a sinvastatina foi capaz de diminuir a viabilidade celular a partir de 48 horas de tratamento, causando a perda de em média 70% na maior dose (5 μ M) e maior tempo de tratamento (72 horas). Após 48 horas de tratamento com 1 e 5 μ M de sinvastatina, houveram alterações significativas na morfologia das duas linhagens, um aumento em torno de 20% de células na fase G1 na linhagem U87MG aumentando também o conteúdo de DNA fragmentado em ambas as linhagens, indicando morte celular. Ainda, houve uma diminuição significativa na migração das duas linhagens já a partir de 24 horas de tratamento. Os dados de expressão de mRNA mostraram, de modo geral, que o tratamento com a sinvastatina foi capaz de favorecer o balanço à favor das TIMPs em relação às MMPs 2, 9 e MT1-MMP. Não houve modulação de RECK canônico (RECKA), tanto da proteína, quanto do mRNA, mas o tratamento diminuiu significativamente os níveis de mRNA do transcrito alternativo RECKB. Ainda, a sinvastatina foi capaz de alterar a localização na membrana de RECK, podendo estar afetando a ação dessa proteína como inibidor de MMPs. Os dados obtidos nesse trabalho ressaltam a importância da sinvastatina como possível adjuvante na terapia anti-tumoral e mostraram que os inibidores de MMPs podem ter uma importante contribuição na contenção da invasão, auxiliando na busca a um melhor prognóstico para pacientes com tumores malignos da glia.

Palavras-Chave: Glioma, Sinvastatina; MMPs; TIMPs

ABSTRACT

Gliomas are the most common tumors of the central nervous system, and in the highest stage of malignancy (also named glioblastoma multiforme - GBM) are incurable. Patient survival in these cases is about 15 months, and a major cause of the mortality is the high invasiveness. The invasion process is due to a family of enzymes, the matrix metalloproteinases (MMPs). The main MMPs involved in glioma invasion are MMPs 2, 9 and the MMP anchored to membrane, MT1-MMP. MMPs are inhibited mostly by their tissue inhibitors (TIMPs) or RECK, a membrane anchored glycoprotein. RECK is situated at the lipid rafts in cell membrane, and is capable of inhibiting by several mechanisms the MMPs 2, 9, and MT1-MMP. Recently, it was described an alternative transcript of the RECK gene (RECKB), and evidences support that, opposed to the canonical transcript, RECKB is related to a malignant phenotype. The TIMPs (4 are known in humans) are soluble, less specific, where TIMP3 appears to have the broadest spectrum of inhibition and TIMP4 is a strong inhibitor of all MMPs. A negative balance MMPs/Inhibitors is critical for the control of invasive process, making important to search for compounds capable of stimulating this balance in favor of the inhibitors. Statins are inhibitors of the enzyme HMG-CoA reductase, essential in the synthesis of cholesterol and isoprenoids derivatives, and are largely used by patients with hypercholesterolemia. Recently, some authors start to associate the use of statins with a lower incidence of cancer in several tumor types (including gliomas). This is mostly due to a decrease of function of proteins essential for proliferation and invasion, such as Ras and Rho, which require isoprenoid derivatives to stay anchored inside the membrane and perform their functions correctly. Therefore, the goal of our study was to investigate the effects of simvastatin on viability, migration and proliferation in human glioblastoma cell lines (U87MG and T98G), and verify if the anti-invasive phenotype assigned to simvastatin induces a change in the balance MMPs/Inhibitors. First, our data showed that simvastatin was able to reduce cell viability after 48 hours of treatment, causing loss of approximately 70% at the highest dose (5 μ M) and longer duration of treatment (72 hours). Furthermore, the treatment significantly changed the morphology of the two cell lines after 48 hours in two doses used (1 and 5 μ M). It was observed an increase of about 20% of cells in G1 phase in cell line U87MG after 48 hours of treatment with increase of DNA fragmentation in T98G and U87MG cell lines. We also found a significant decrease in migration of the two cell lines in 24 hours of treatment, in a time and dose-dependent manner. In general, the treatment with simvastatin favored the balance of TIMPs/MMP2, 9 e MT1-MMPs to the inhibitors, in the mRNA level. There was no modulation of the canonical RECK (RECKA), in the protein and mRNA, but treatment significantly decreased the levels of RECKB mRNA. Simvastatin was able to change the location in the membrane of RECK, and this may be affecting the action of this protein as an inhibitor of MMPs. The data obtained in this study emphasize the importance of simvastatin as a potential adjuvant in anti-tumor therapy and showed that MMP inhibitors may have an important contribution in the containment of invasion assigned to simvastatin, helping in the search to a better prognosis for patients with malignant glial tumors.

Key Words: Glioma, Simvastatin; MMPs; TIMPs

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO DE ATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS RHO.....	29
FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA VIA DE P53, ALTERADA EM 87% DOS GLIOMAS.....	31
FIGURA 3 - DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS MMPS.....	35
FIGURA 4 - EXPRESSÃO DE MMPS E TIMPS NOS VÁRIOS NÍVEIS DE MALIGNIDADE DE GLIOMAS.....	37
FIGURA 5 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA RECK.....	41
FIGURA 6 - MODELO DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPS POR RECK...	42
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE RECK.....	45
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTÉICOS CODIFICADOS PELOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE RECK.....	46
FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DA SINVASTATINA E SUA AÇÃO NA CASCATA DE SÍNTESE DO COLESTEROL.....	47
FIGURA 10 - ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO TRATADAS COM SINVASTATINA.....	66
FIGURA 11 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS T98G E U87MG APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	68
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DA LINHAGEM U87MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	70
FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO DA LINHAGEM T98G NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	71
FIGURA 14 - CONTEÚDO DE DNA FRAGMENTADO NAS CÉLULAS T98G E U87MG APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	72
FIGURA 15 - INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO NAS CÉLULAS T98G E U87MG APÓS O TRATAMENTO APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	74
FIGURA 16 - MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DO ENSAIO DE SCRATCH.....	75
FIGURA 17 - MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2, 9 E MT1-MMP APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	77

FIGURA 18 - MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS INIBIDORES SOLÚVEIS CLÁSSICOS DAS MMPS (TIMPS) APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	78
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPS DA LINHAGEM U87MG.....	80
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPS DA LINHAGEM T98G.....	82
FIGURA 21 - MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECK CANÔNICO (RECKA) E SUA ISOFORMA ALTERNATIVA RECKB APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	84
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES RECKA/RECKB DAS LINHAGENS T98G E U87MG APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	85
FIGURA 23 - DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECK CANÔNICA (RECKA) NOS EXTRATOS DE PROTEÍNA TOTAL DA LINHAGEM U87MG E T98G APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	86
FIGURA 24 - ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA MMP 2 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	87
FIGURA 25 - DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS RECK E FLOTILINA NAS FRAÇÕES OBTIDAS PELO ISOLAMENTO DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTES.....	89
FIGURA 26 - PROPOSTA DA CONTRIBUIÇÃO DO AUMENTO DE TIMPS E DIMINUIÇÃO DE RECKB NA CONTENÇÃO DA INVASÃO EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS TIMPS ENCONTRADAS MAMÍFEROS.....	32
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA.....	59
TABELA 3 - SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE qRT-PCR.....	60
TABELA 4 - DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	62
TABELA 5 - RESUMO DA AÇÃO DA SINVASTATINA SOBRE AS RAZÕES DE EXPRESSÃO NO NÍVEL DE MRNA DE TIMPS E MMPS NAS LINHAGENS U87MG E T98G.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATM	Proteína Ataxia telangiectasia mutada
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	Proteína Linfoma de células B 2
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	Soro Albumina Bovina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CDK	Quinase Dependente de Ciclinas
cDNA	DNA complementar
ChK	Quinase <i>Checkpoint</i>
CREB	Proteína de resposta à ligação do cAMP
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FAK	Quinase de Adesão Focal
FPP	Farnesil Pirofosfato
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GBM	Glioblastoma Multiforme
GGPP	Geranylgeranyl Pirofosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Guanosina trifosfato
Hdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i> Humano
HMBS	Hidroximetilbilano sintase

HMG-CoA 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A

HPRT Hipoxantina Fosforibosil Transferase

HUVECs Human umbilical vein endothelial cells

JAMA Jornal da Associação Médica Americana

MAPK Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MMP Metaloproteinase de Matriz

mRNA RNA mensageiro

MT-MMP Metaloproteinase de Matriz do tipo associado à Membrana

mTOR *Mammalian Target of Rapamycin*

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NF-κB Fator Nuclear κB

PAGE Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PBS Solução Salina Fosfato Tamponada

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PDGFR Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

PDK1 Quinase dependente de 3-fosfoinositol 1

PI Iodeto de Propídeo

PI3K Fosfatidilinositol 3-Quinase

PIP2 Fosfatidilinositol-4,5-difosfato

PIP3 Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKB Proteína Quinase B

PKC Proteína Quinase C

PMSF Fenilmetilsulfonilfluorido

PP1 Proteína Fosfatase 1

PTEN Fosfatase lipídica homóloga a Tensina e à Fosfatase

qPCR PCR quantitativa

Rb Proteína do Retinoblastoma

RECK Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs

Rho-GAP Proteína ativadora de Rho-GTPases

Rho-GEF Fator de Troca de Nucleotídeo de Guanina

RNA Acido Ribonucléico

ROCK Quinase Rho

RTK Receptor de Tirosina Quinase

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

SFB Soro Fetal Bovino

SNC Sistema Nervoso Central

SNPs Polimorfismo de Nucleotídeo Único

TF Fator Tissular

TIMP Inibidor Tissular de Metaloproteinase

TNF- α Fator de Necrose Tumoral α

uPa Plasminogênio Uroquinase

VEGFR Receptor do Fator de Crescimento Epitelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO GERAL	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 O Câncer	22
3.2 As Células da Glia	23
3.3 Os tumores da Glia	24
3.4 Principais vias de sinalização envolvidas em glioblastomas multiformes.	27
3.4.1 Via do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)	27
3.4.2 Proteínas Rho	29
3.4.3 p53... ..	30
3.4.4 pRB.... ..	32
3.5 A Matriz Extracelular (ECM) e as Metaloproteinases de Matriz (MMPs)	33
3.5.1 A Matriz Extracelular	33
3.5.2 As MMPs	34
3.5.2.1 MMPs e Gliomas	36
3.6 Inibidores de MMPs	38
3.6.1 TIMPs	38
3.6.2 RECK	40
3.6.2.1 Transcritos alternativos de RECK.....	45
3.7 As estatinas e sua atividade como anti-tumoral	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Procedimentos em cultivo celular	53
4.1.1 Esterilização dos materiais.....	53
4.1.2 Soluções e meio de cultura	53
4.1.2.1 Solução salina tamponada (PBS).....	53
4.1.2.2 Solução de tripsina-EDTA	53
4.1.2.3 Solução de sinvastatina.....	54
4.1.2.4 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (PI).....	54
4.1.2.5 Meios de cultura	54
4.2 Linhagens celulares.....	55
4.2.1 Condições de cultivo	55
4.3 Ensaio para análise de viabilidade celular através do método de MTT	55
4.4 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo	56
4.5 Ensaio de Scratch in vitro.....	57

4.6 Avaliação da expressão de RECK (e transcritos alternativos), MMPs e TIMPs. .57	
4.6.1 Análise dos níveis de mRNA após o tratamento com sinvastatina.....57	
4.6.1.1 Extração e purificação do RNA celular57	
4.6.1.2 Síntese de cDNA.....59	
4.6.1.3 Análise da modulação da expressão gênica60	
4.7 Avaliação dos níveis protéicos por Western Blotting61	
4.8 Zimografia em gelatina62	
4.9 Isolamento de membranas resistentes a detergente.....63	
4.10 Análises Estatísticas64	
5 RESULTADOS.....65	
5.1 Análise morfológica65	
5.2 Viabilidade celular67	
5.3 Progressão do ciclo celular70	
5.4 Ensaio de scratch in vitro73	
5.5 Análise dos níveis de mRNA das MMPs e seus inibidores76	
5.6 Avaliação dos níveis protéicos de RECK85	
5.7 Zimografia87	
5.8 Isolamento de membranas resistentes a detergentes88	
6 DISCUSSÃO90	
7 CONCLUSÕES100	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS102	

1 INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores ocasionados pela divisão desordenada das células da glia, um dos dois tipos principais de células que compõe o sistema nervoso central. A glia é composta por quatro tipos celulares distintos, astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e microglia.

Os gliomas são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (AKBASAK&SUNAR-AKBASAK, 1992) e entre estes, destacam-se os astrocitomas. Os astrocitomas são classificados de I a IV de acordo com seu grau de malignidade: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (GBM-grau IV) (MAHER *et al.*, 2001). É importante ressaltar que o glioblastoma multiforme continua sendo um desafio para os tratamentos utilizados na clínica médica, devido ao seu alto grau de invasividade e pelo conseqüente baixo índice de sobrevida dos pacientes, que varia entre 12 e 15 meses (MINNITI *et al.*, 2009). O tratamento utilizado hoje é a quimioterapia associada à radioterapia, mas o glioblastoma multiforme é tido ainda como incurável (OHKA *et al.*, 2012). A característica invasiva faz com que esse tipo de neoplasia tenha uma alta taxa de recidiva, pois mesmo retirando a massa tumoral, algumas células malignas são capazes de desprender-se do tumor original e alocar-se no tecido normal adjacente, em alguns casos atingindo até o hemisfério oposto ao seu local de origem, podendo originar novos tumores (BELLAIL *et al.*, 2004).

O processo invasivo depende da capacidade da célula tumoral em degradar e remodelar a matriz extracelular (ECM) à sua volta, processo realizado por metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco envolvidas no remodelamento da ECM que degradam, com diferentes especificidades, colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas de matriz. Em conjunto, são capazes de degradar todas as moléculas da ECM (AIMES& QUIGLEY, 1995; BASBAUM& WERB, 1996; BOSMAN& STAMENKOVIC, 2003).

Além dos substratos da ECM, MMPs também clivam moléculas da superfície celular, proteínas circulantes, entre outras moléculas, regulando o microambiente

celular (STERNLICHT & WERB, 2001). As MMPs são capazes de promover a alteração das interações célula-célula e célula-matriz, a liberação, ativação (ou inativação) de moléculas sinalizadoras e receptores da superfície celular, favorecendo assim, entre outros processos, a invasão celular.

A atividade das MMPs pode ser regulada por seus inibidores tissulares solúveis clássicos, as TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) ou por RECK (REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs). A proteína supressora de tumor RECK, é atualmente o único inibidor de MMPs de superfície celular já caracterizado. O gene *RECK* codifica para uma glicoproteína que está ligada à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), localizada principalmente nos microdomínios da membrana ricos em colesterol, chamados de *lipid rafts*, sendo essa localização importante para que esta molécula exerça as suas funções (OMURA *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2011). RECK é capaz de inibir especificamente 3 tipos de metaloproteinases de matriz, MMP2, MMP9 e MT1-MMP (OH *et al.*, 2001; SASAHARA *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 1998) cujas atividades estão freqüentemente elevadas em vários tipos de tumores malignos, incluindo gliomas (CHINTALA *et al.*, 1999). Além da forma canônica de RECK, foram identificados pelo nosso grupo transcritos alternativos de *splicing* desse gene que parecem ter uma função distinta da forma canônica e um papel significativo durante a progressão de gliomas.

As TIMPs são os inibidores solúveis clássicos das MMPs. Quatro tipos diferentes de TIMPs foram descritas e caracterizadas até hoje, sendo o conjunto das 4 capazes de inibir todas as MMPs ativas já conhecidas (BAKER *et al.*, 2002). As TIMPs inibem as MMPs numa razão de 1:1, onde TIMP1 inibe a maioria das MMPs, mas inibe fracamente MT-MMPs. A TIMP2, 3 e 4 inibem todas as MMPs conhecidas. Entre todas as TIMPs, a TIMP3 possui o espectro de inibição mais amplo (NAGASE & MURPHY, 2008), e a TIMP4 parece ser um inibidor forte de todas as MMPs (revisado por HAGEMANN, 2012). A razão entre MMPs e seus inibidores a favor das MMPs é essencial para a invasão das células de glioma (PLANCHENAUT *et al.*, 2001).

Sendo assim, torna-se fundamental a busca de compostos capazes de alterar a razão MMPs/Inibidores em favor dos inibidores, podendo permitir o desenvolvimento de novas estratégias para a terapia anti-tumoral de gliomas.

Drogas da classe das estatinas são fortes inibidores da HMG-CoA redutase, enzima chave na cascata de síntese de colesterol, e hoje são largamente prescritas em todo o mundo para pacientes com hipercolesterolemia (OSMAK, 2012). Por diminuírem os níveis de colesterol e isoprenóides, as estatinas vêm sendo bastante estudadas também por exercerem ações anti-tumorais. Muitas dessas ações devem-se ao fato de que várias proteínas correlacionadas com invasão e proliferação celular (como Ras e Rho) necessitam de modificações pós-traducionais, como a adição de moléculas isoprenóides, para manterem-se no lado interno da membrana plasmática e assim exercerem suas funções corretamente (OSMAK, 2012). As estatinas também podem interferir na composição da membrana das células, inibindo a proliferação, já que células tumorais estão constantemente em divisão e necessitam de colesterol em suas membranas celulares (GLIEMROTH *et al.*, 2003). Níveis reduzidos de colesterol também estão correlacionados com a disrupção dos microdomínios de membrana chamados de *lipid rafts*, modificando a localização de Fas, e facilitando assim o processo de apoptose (WU *et al.*, 2009). O efeito pró-apoptótico atribuído as estatinas deve-se ainda a translocação de Bax para a mitocôndria, liberação de citocromo C e ativação da caspase 3 (DEMIERRE *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostram principalmente os efeitos anti-invasivos da sinvastatina ligados às proteínas Rho, mas a importância das MMPs e seus inibidores nesse processo ainda não foi elucidada (NARUMIYA *et al.*, 2009).

Assim, o objetivo geral deste trabalho é avaliar a contribuição dos inibidores de MMPs (RECK e TIMPs) no efeito anti-invasivo da sinvastatina, bem como seus efeitos na membrana celular, utilizando como modelo células de glioma humano grau IV.

Para cumprir este objetivo foram utilizadas duas linhagens altamente invasivas de glioblastoma humano (U87MG e T98G) tratadas ou não com diferentes concentrações de sinvastatina por períodos de tempo distintos. Nesse trabalho, buscou-se complementar e corroborar os dados da literatura sobre a citotoxicidade causada pela sinvastatina e seus efeitos em promover parada de proliferação e inibição da migração nas linhagens escolhidas. A seguir, investigamos a correlação desses dados fenotípicos com a análise das MMPs e seus inibidores, utilizando a expressão de mRNA e proteína, atividade e localização na membrana.

O desenvolvimento deste estudo visou contribuir com a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no processo invasivo dos tumores da glia, assim como um melhor entendimento dos compostos capazes de reverter esse fenótipo, evidenciando a importância dos inibidores de MMPs como supressores tumorais.

2 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista o desafio atual de se obter estratégias mais efetivas de tratamentos de glioblastomas, em conjunto com o fundamental papel dos inibidores de MMPs na contenção do processo invasivo, o objetivo geral deste trabalho foi entender e caracterizar a contribuição dos inibidores de MMPs no processo anti-invasivo atribuído à sinvastatina em modelo de glioma humano.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No contexto apresentado acima, o presente trabalho teve como objetivos específicos, avaliar em linhagens de glioblastoma humano (U87MG e T98G) os efeitos da sinvastatina em promover:

- Alterações na morfologia celular;
- Alterações na viabilidade celular;
- Alterações na progressão do ciclo celular;
- Inibição da migração celular;
- Modulação da expressão a nível de mRNA das MMPs 2, 9 e da MT1-MMP e seus inibidores *RECK* (e seu transcrito alternativo de *splicing*, RECKB) e TIMPs;
- Modulação da expressão da proteína RECK canônica;
- Variações na atividade das MMPs;
- Modificação na localização celular de RECK.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Câncer

Durante o processo de tumorigênese são descritas, na grande maioria dos casos, a ocorrência de mutações ou alguma ativação anormal de genes que controlam o crescimento e a mitose celular, causando assim uma divisão desordenada e descontrolada dessas células transformadas, comprometendo o tecido de origem e podendo estender-se à outros órgãos em caso de ocorrência de metástase (WEINBERG, 2008). Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos celulares de onde se originam, à velocidade de crescimento da massa tumoral, à capacidade de invasão e ao tipo de mutação que deu origem à transformação celular.

A incidência de vários tipos de tumores vem crescendo devido ao aumento da exposição da população a fatores de risco. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou para no ano 2030, 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes em decorrência da doença, e 75 milhões de pessoas anualmente lutando contra algum tipo de neoplasia. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. O número de óbitos vem diminuindo com o tempo conforme a evolução dos tratamentos, porém alguns tipos de tumores ainda são muito difíceis de serem tratados e destacam-se pela alta taxa de mortalidade. Entre estes, os tumores de cérebro e do Sistema Nervoso Central (SNC) chamam a atenção por apresentarem um dos piores prognósticos. Apesar de esses tumores contribuírem na taxa de mortalidade com apenas 2% entre todos os pacientes com câncer, a sobrevida média nesses casos é de apenas 15 meses.(OSBORNE *et al.*, 2001; DEMUTH & BERENS, 2004).

3.2 As Células da Glia

O tecido cerebral é constituído por dois componentes celulares principais: (1) os neurônios, células com grandes prolongamentos responsáveis pelos impulsos nervosos, e (2) células da glia ou neuroglia, que sustentam os neurônios e participam de várias outras funções importantes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). As células da glia se dividem em 4 tipos celulares distintos. São eles:

Oligodendrócitos: Células responsáveis pela produção da bainha de mielina, que são prolongamentos não contínuos que se enrolam em volta dos axônios. Servem de isolante elétrico para os neurônios do sistema nervoso central (SNC). A mielinização dos axônios proporciona um impulso elétrico muito mais rápido e eficaz. Defeitos referentes às essas células e suas funções podem ocasionar doenças, como esclerose múltipla, entre outras. São também chamadas de células de Schwann quando no Sistema Nervoso Periférico (BRADL; LASSMANN, 2010).

Astrócitos: Representam cerca de 50% das células glias cerebrais, compondo $\frac{1}{4}$ do total da massa encefálica e são as células de maior diversidade funcional (KRAWCZYK; JAWORSKA-ADAMU, 2010). Possuem formato estrelado, e ligam os neurônios aos capilares sanguíneos e a pia-máter (uma camada delgada de tecido conjuntivo que reveste o SNC). Dentre as células da glia, os astrócitos além da função de sustentação, participam do controle da composição iônica e molecular do ambiente extracelular dos neurônios, têm papel chave na angiogênese cerebral, na produção e excreção de proteínas de matriz extracelular, neurotransmissão, detoxificação, fagocitose e resposta imune, entre outras funções (MONTGOMERY, 1994)

Células endimárias: São células epiteliais colunares que revestem os ventrículos do cérebro e o canal da medula espinhal. Em alguns locais, as células endimárias são ciliadas, o que facilita a movimentação do líquido cefalorraquidiano. Possuem maior importância durante o desenvolvimento embrionário. O movimento ciliar das células endimárias ainda pode ter um papel importante na resposta frente infecções virais (DEL BIGIO, 2010).

Microglia: As células da microglia são pequenas e alongadas, com prolongamentos curtos e irregulares. Têm função fagocitária e derivam dos precursores trazidos da medula óssea pelo sangue, representando o sistema morfonuclear fagocitário no sistema nervoso central. Interagem com elementos neuronais e não neuronais. Estudos recentes mostram a importância da microglia no remodelamento do ambiente perisináptico, podendo interferir na plasticidade e função neuronal (TREMBLAY, *et al.*, 2011).

3.3 Os tumores da Glia

Os tumores da glia são genericamente conhecidos como gliomas, e iniciam-se a partir de alterações neoplásicas em algum dos 4 tipos celulares que compõe a glia. Os gliomas são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em: astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas. De cada 10 tumores cerebrais malignos, 7 a 8 são gliomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; MINNITI *et al.*, 2009).

Estimou-se para o ano de 2012 no Brasil 4.820 casos novos de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) em homens e 4.450 em mulheres, sendo a incidência ligeiramente mais alta no sexo masculino do que no feminino. Esses valores correspondem a um risco de aproximadamente 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (FONTE: INCA). Mundialmente, as taxas de incidência são maiores em países mais desenvolvidos, chegando de 7,5-14 novos casos em homens a cada 100 mil habitantes na Europa, Nova Zelândia e América do Norte e isso deve-se à melhoria e à introdução de novas tecnologias diagnósticas menos invasivas, como, por exemplo, tomografia computadorizada, ressonância magnética, entre outros, mas características étnicas não podem ser descartadas (FILIPPINI, 2012). Mesmo não sendo dos mais frequentes, esse câncer contribui significativamente para a morbidade global. A distribuição etária da incidência possui uma característica curiosa, contendo um pico em crianças, atingindo até 20% de todos os tumores pediátricos, e outro em adultos acima dos 45 anos. Na maioria dos países desenvolvidos, a mortalidade por essa neoplasia ocupa a 12ª posição (Fonte: INCA; FILIPPINI, 2012). O prognóstico para crianças ainda é melhor do que para adultos, em uma média de 65% de cura para todos os tumores de SNC (FILLIPINI, 2012).

A etiologia desse câncer ainda é pouco conhecida, mas a irradiação terapêutica é sabidamente uma de suas causas, mesmo que a ocorrência nesses casos seja muito rara. Traumas físicos na região da cabeça e traumas acústicos (casos de trabalhadores expostos a alto nível de som) também podem ser causadores de risco para tumores do SNC. Exposições a certos produtos também são consideradas como possíveis fatores de risco, como acontece com trabalhadores da indústria petroquímica, lavradores, embalsamadores, entre outros. Alguns estudos sugerem que radiação gerada por radiofrequência, telefonia móvel e telecomunicação está associada à etiologia desses tumores, porém isso ainda não foi confirmado (FONTE: INCA, FILIPPINI, 2012).

Os gliomas também são classificados de acordo com seu grau de malignidade em uma escala de I a IV. Tumores de grau I são benignos e podem ser removidos cirurgicamente caso seja considerada a incisão cirúrgica no momento do diagnóstico; já os tumores de grau II são avaliados como baixo grau, mas que podem se desenvolver por longo curso clínico, e não são curáveis cirurgicamente; os tumores de grau III são considerados malignos e podem levar a óbito em poucos anos; os tumores de grau IV são altamente malignos e letais dentro de 9-12 meses. Cerca de 70% dos gliomas grau II podem se transformar em grau III e IV dentro de 5-10 anos do diagnóstico inicial, e em seguida, se comportam clinicamente como os tumores de alto grau (MAHER *et al.*,2001). Um estudo populacional de Ohgaki e colaboradores publicado em 2004 abrange os anos de 1980-1994 e mostra que pacientes com tumores malignos secundários, ou seja, aqueles que evoluem de um grau de malignidade mais baixo para um mais alto, possuem uma taxa de sobrevivência significativamente maior quando comparado aos pacientes que desenvolvem o tumor de mais alto grau diretamente (glioblastoma primário).

Dentre todos os tipos de gliomas, os tumores mais comuns são os astrocitomas, que representam cerca de 3 a cada 10 tumores cerebrais. Os astrocitomas de baixo grau (pilócítico – grau I, difuso – grau II) possuem um crescimento lento; os de grau intermediário (anaplásico – grau III) crescem em um ritmo moderado a acelerado e os astrocitomas de grau elevado (também chamados de glioblastoma multiforme – grau IV) possuem um rápido crescimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY, 2010).

Os sintomas dos pacientes com glioma podem variar dependendo o tipo de tumor, porém em um estudo do grupo “Glioma Outcomes Project”, publicado no *The Journal of the American Medical Association (JAMA)* em 2005, foi demonstrado que a principal queixa dos pacientes foi uma forte dor de cabeça seguida por perda de memória.

Uma das características preponderantes dos gliomas malignos, e que dificulta muito o tratamento e cura deste tipo de neoplasia, é sua capacidade de invadir o tecido adjacente. Em vários casos de excisão cirúrgica de um tumor invasivo, foram encontradas células tumorigênicas no hemisfério cerebral oposto ao tumor original, sendo essas células, na maioria das vezes isoladas e capazes de formar um novo tumor. Esse comportamento é responsável pela alta taxa de recidiva, onde a maioria dos pacientes com glioblastoma acaba sofrendo com a recorrência do tumor, e ainda não existe opção de tratamento padrão após a recidiva (WICK *et al.*, 2011). Entretanto, esses tumores raramente formam metástase, fato que corrobora com a observação de ausência de invasão vascular por células de glioma primários, em conjunto com a ausência de vasos linfáticos no interior do cérebro, sugerindo que esse tipo de tumor é bastante adaptado ao microambiente cerebral (BELLAIL *et al.*, 2004). Um importante grupo de enzimas, as metaloproteinases de matriz (MMPs), foi relacionado ao processo de invasão em quase todos os tipos de tumores, incluindo os gliomas. Nos últimos anos, as MMPs têm sido apontadas como alvos promissores para a terapia do câncer, com base na sua regulação e capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e facilitar a invasão tecidual pelas células tumorigênicas (RAO, 2003; FROHLICH, 2010).

Os gliomas são tratados hoje com incisão cirúrgica e/ou utilizando o quimioterápico temozolomida, um agente alquilante diverso da classe dos triazenos que atua causando dano citotóxico nas células em todas as fases do ciclo celular, mas devido à alta toxicidade não seletiva, esse tratamento possui severos efeitos colaterais. A quimioterapia nesses casos é normalmente associada à radioterapia, porém os glioblastomas multiformes são tidos hoje como incuráveis (OHKA *et al.*, 2012).

3.4 Principais vias de sinalização envolvidas em glioblastomas multiformes.

As alterações genéticas mais comuns em GBMs estão relacionadas com a ativação ou supressão anormal de vias de transdução de sinal e resistência à radioterapia e quimioterapia. O resultado principal dessas mutações genéticas é a sinalização constitutiva e aumentada de vias de sobrevivência e defeitos na maquinaria que sinaliza para a morte celular programada (apoptose). Estudos clínicos preliminares mostram que nenhum dos inibidores que atue somente em uma dessas vias consegue aumentar a sobrevida de pacientes com GBM, e alguns estudos de fase II vêm tentando explorar a combinação de alguns desses inibidores (MINNITI *et al.*, 2009). Uma atenção especial vem sendo dada aos intermediários intracelulares dessas vias de sinalização como possíveis alvos na terapia contra o glioblastoma multiforme. As principais vias envolvidas estão descritas brevemente a seguir:

3.4.1 Via do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)

A via de PI3K é responsável pelo estímulo de muitas funções celulares, como sobrevivência e proliferação celular e também invasão (KWIATKOWSKA & SYMONS, 2013) Os receptores de tirosina quinase mais ativos em GBMs são EGFR (mutado ou amplificado em 45% dos GBMs) e PDGFR (amplificado em 13% dos GBMs) (WICK *et al.*, 2011). A molécula de PI3K (mutada em 15% dos GBMs) é translocada para a membrana plasmática através da ligação a resíduos de fosfotirosina nos RTK. A PI3K, agora ativada, produz fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) à partir de fosfatidilinositol-3,4 difosfato (PIP₂). O acúmulo de PIP₃ recruta a quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK1) e AKT (amplificada em 2% dos GBMs) à membrana plasmática. A proteína AKT então pode ser ativada por PDK1 e também pelo complexo 2 de mTOR, que, em conjunto promoverão a sobrevivência da célula por facilitar a translocação nuclear do fator nuclear κB (NFκB), que é responsável pela ativação da transcrição de diversos genes responsáveis pela sobrevivência e proliferação. Ainda, a autofosforilação da proteína FAK (quinase de adesão focal – ativada por EGFR e algumas integrinas) permite a interação com

vários efetores, entre eles, membros da família SRC, que resultará na ativação tanto da via PI3K, quanto da família de proteínas Rho-GTPases (CLARK *et al.*, 1998).

A proteína PTEN funciona como um supressor tumoral nessa via de sinalização, desfosforilando PIP3 à PIP2, e assim freando a cascata de AKT. Vale ressaltar que PTEN é um dos principais genes alterados em GBM, estando mutado ou deletado em 36% dos casos (KRAKSTAD & CHEKENYA, 2010; WICK *et al.*, 2011; KWIATKOWSKA & SYMONS, 2013).

A via de PI3K também é capaz de comunicar-se com a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) via Ras, uma proteína G ligada à membrana por derivados de isoprenóides, onde PI3K é uma das proteínas efetoras de Ras, que encontra-se mutada em 2% dos casos de GBMs. Ras inicia a cascata de sinalização após ativação de RTK, como por exemplo EGFR ou PDGFR. A presença do ligante ou a ativação constitutiva desses receptores de tirosina quinase levam à autofosforilação de resíduos de tirosina intracelulares e ativação de Ras. A proteína Ras agora ativa, recruta a proteína Raf à membrana celular, onde a proteína Raf ativada fosforila e ativa MAPK (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno), e a cascata culmina na ativação de ERK (quinase ativada por sinal extracelular). As ERKs são responsáveis por transmitir sinais proliferativos e de sobrevivência celular através da fosforilação de vários alvos no citoplasma, citoesqueleto e fatores de transcrição nucleares (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010).

A via de PI3K também está relacionada a migração em glioblastoma multiforme. A ligação do ligante FasL à CD95 em células de glioblastoma recruta e ativa a proteína quinase Src, que então ativará a PI3K, aumentando a migração celular *in vitro*. É importante ressaltar que o ligante FasL, que promove a apoptose em muitos tipos celulares também é responsável pela sua invasividade (KWIATKOWSKA & SYMONS, 2013).

Ressaltando a importância dessa via em GBMs, foi visto que um novo inibidor químico sintético de PI3K, denominado PX-866, que age ligando-se covalentemente ao sítio catalítico da enzima, mostrou diminuir a invasividade e angiogênese de células de glioblastoma *in vitro*. No modelo *in vivo*, o inibidor causou

uma diminuição do crescimento do tumor, prolongando a sobrevivência do animal com tumores intracranianos (KOUL *et al.*,2010) .

3.4.2 Proteínas Rho

As Rho GTPases são proteínas da superfamília Ras, que também inclui a família das proteínas Rab, Arf e Ran. As proteínas Rho diferem das outras proteínas da família Ras pela presença de um domínio específico Rho, e são super conservadas tanto em plantas quanto em mamíferos, onde são mais de 20 membros identificados até o momento (VEGA & RIDLEY, 2008). Como Ras, as Rho-GTPases possuem modificações pós-traducionais de derivados isoprenóides que permitem seu ancoramento na parte interna da membrana celular, e podem ciclar entre seu estado GDP- ou GTP-ligados (figura 1, parte A e C). A ligação à GTP promove sua ativação e é realizada pelo fator de troca de nucleotídeo de guanina Rho (ou Rho-GEF – figura 1, parte B), culminando na ativação de proteínas efetoras (figura 1, parte D), e a hidrólise do GTP à GDP causando sua inativação é realizada por proteínas ativadoras de Rho-GTPases (ou Rho-GAPs) (SAHAI & MARSHAL, 2002), como demonstrado na figura 1, a seguir:

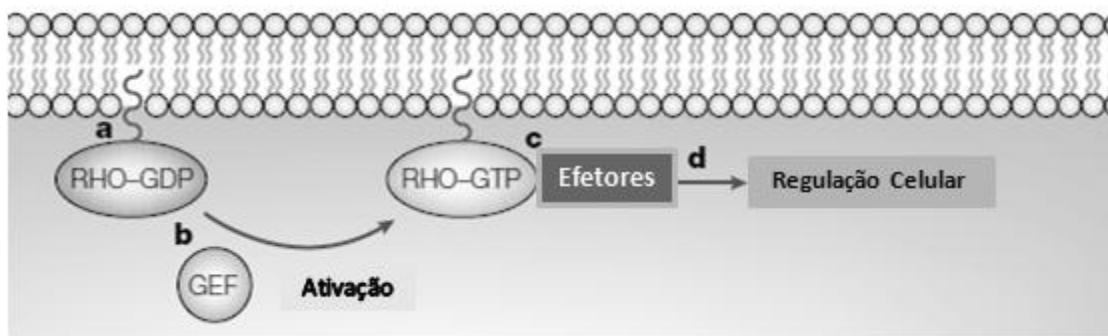


Figura 3: MODELO DE ATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS RHO. GDP= Guanosina difosfato; GTP= Guanosina Trifosfato; GEF= Fator de troca de nucleotídeo de guanina. Adaptado de:SAHAI & MARSHAL, 2002.

A ativação das Rho-GTPases vem sendo relacionada a diversos processos celulares como organização dos microtúbulos e filamentos de actina, divisão celular, mobilidade, tráfego de vesículas, fagocitose, regulação transcricional, e regulação da vascularização tumoral, sendo capazes de promover a liberação de fatores pró-angiogênicos (VEGA & RIDLEY, 2008). Ao contrário de Ras, Rho é raramente encontrada em sua forma mutada em tumores, mas sua expressão e atividade estão frequentemente alteradas. Por exemplo, várias Rho-GTPases são super expressas

em tumores humanos, como RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, Wrch2/RhoV and RhoF (VEGA & RIDLEY, 2008)

As proteínas RhoA, Rac1 e Cdc42 são os membros melhores caracterizados da família Rho. Rac1 é responsável por controlar a formação de lamelipódios, que são protusões da membrana celular ricos em actina. RhoA regula a contractilidade da actomiosina, formação das adesões focais e fibras de stress, e retração da “cauda” da célula durante a migração celular. Já Cdc42 regula a formação de filopódios, também protusões na membrana celular, e é uma proteína chave na regulação da polarização celular (KWIATKOWSKA & SYMONS, 2013).

As proteínas Rho ainda possuem um importante papel na progressão do ciclo celular, podendo atuar de duas maneiras: permitir a ativação de ERK ativando a ciclina D1, ou induzindo a expressão da ciclina D1 via Rac-Cdc42 (VEGA & RIDLEY, 2008). Ainda, a proteína RhoA é necessária para a completa fosforilação e consequente ativação da quinase de adesão focal (FAK), uma quinase bastante importante no processo de invasão (CLARK *et al.*, 1998). Esse trabalho ainda mostra que a proteína Rho Cdc42 controla a ativação de AKT, envolvida na via de PI3K descrita anteriormente.

Uma das moléculas efetoras mais importantes no processo de invasão celular é a quinase Rho (ROCK), que é capaz de fosforilar e ativar diversos substratos. ROCK encontra-se naturalmente em seu estado com a conformação fechada, inativa. Sua ativação acontece quando Rho liga-se a ela e muda sua conformação para a forma aberta, agora ativa. A via de RhoA/ROCK é responsável por induzir a migração celular através da contração da actomiosina, como mencionado anteriormente. O bloqueio das proteínas Rho (incluindo Rac) é capaz de inibir a transcrição de MMPs. RhoC possui um importante papel na tumorigênese, também estando envolvida diretamente com a invasão (VEGA & RIDLEY, 2008).

3.4.3 p53

A proteína p53 é chamada de “guardião das células” e encontra-se mutada ou deletada em 35% dos casos de glioblastoma multiforme, e alterações em sua via

estão presentes em 87% dos casos de GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2010). A proteína p53 é responsável pela resposta celular a danos. Caso o dano seja passível de reparo, p53 é capaz de frear o ciclo celular para que isso aconteça, e caso o dano seja grave o suficiente para que não haja possibilidade de reparo, p53 então emite sinais para que a célula entre em apoptose, evitando que uma célula defeituosa sobreviva e progrida podendo acumular mutações e gerar uma célula tumorigênica (WEINBERG, 2008). Um esquema resumido da via de p53 encontra-se na figura 2, abaixo.

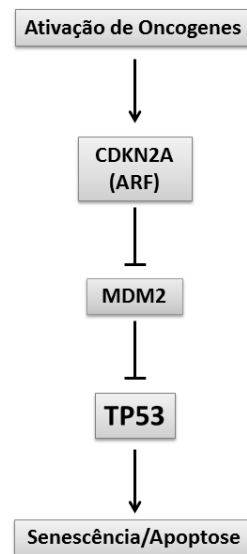


Figura 4: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA VIA DE p53, ALTERADA EM 87% DOS GLIOMAS. CNKN2A indica a quinase inibidora dependente de ciclina 2ª (ou p16) deletada em 48% dos GBMs; Mdm2 indica *murine double minute 2*, ou Hdm2 em humanos, amplificada em 14% dos GBMs; TP53 indica o gene que codifica para a proteína p53 em humanos, mutada em 35% dos GBMs. FONTE: Adaptado de Cancer Genome Atlas Research Network, 2010.

A proteína Mdm2 é capaz de ligar-se a p53 e evitar que ela execute sua função como um fator transcricional. Após isso, Mdm2 direciona a ligação de uma molécula de ubiquitina a p53 e a exportação desta do núcleo (onde p53 realiza a maior parte de seu trabalho) para o citoplasma; a subsequente poliubiquitilação de p53 assegura sua rápida degradação em proteassomos citoplasmáticos. Sendo assim, Mdm2 assegura a curta meia-vida de 20 minutos de p53 em células normais (CLARK; LLANOS; PETERS, 2002). Logo que acontece algum dano na célula, quinases como ATM, Chk1 e Chk2 detectam esse erro, são ativadas e fosforilam resíduos de p53. A proteína p53 então fosforilada bloqueia a capacidade da proteína Mdm2 se ligar à ela e evita sua degradação via proteassomo, acumulando p53 em níveis protéicos funcionalmente significativos em resposta ao estresse. Ao mesmo

tempo, a quinase ATM também pode fosforilar Mdm2 de uma forma que causa sua inativação funcional e aumente consequentemente os níveis de p53 (CLARK; LLANOS; PETERS, 2002). A proteína ARF (CDKN2A) é capaz de ligar-se à Mdm2, levando a estabilização de p53, funcionando desta maneira como um supressor tumoral (CLARK; LLANOS; PETERS, 2002).

A atividade e os níveis de Mdm2 também podem ser afetados por outras cascatas de sinalização. A via de PI3K (vista anteriormente) leva, por meio da AKT/PKB, à fosforilação de Mdm2 (em um sítio diferente de ATM), que culmina na sua translocação do citoplasma para o núcleo, onde pode atuar reduzindo os níveis de p53. A ativação de vias de sinalização mitogênicas de Ras/Raf/MAPK leva, por meio de fatores de transcrição AP1, à transcrição bastante elevada de Mdm2. Níveis elevados de Mdm2 amplificam a ativação induzida por fosforilação de Mdm2, alcançada pela via de sinalização PI3K/Akt/PKB. Finalmente, todos esses efeitos convergem na supressão dos níveis da proteína p53 (WEINBERG,2008).

3.4.4 pRB

Outra via de sinalização importante envolvida em glioblastomas é a via da proteína do retinoblastoma (pRB), alterada em 78% dos casos (Cancer Genome Atlas Research Network, 2010). Essa via está envolvida principalmente no controle do ciclo celular, e na tumorigênese. Quando esta via encontra-se alterada, tem-se uma divisão rápida e desordenada das células.

A proteína pRB é uma fosfoproteína presente no núcleo, e estudos iniciais com pRB revelaram que ela sofria fosforilação simultaneamente com o avanço das células pelo ciclo celular. Mais especificamente, pRB é basicamente não fosforilada quando as células estão em G₀. Elas tornam-se pouco fosforiladas (hipofosforiladas) em um reduzido número de serinas e treoninas após a entrada em G₁. De maneira importante, pRB torna-se extensivamente fosforilada (hiperfosforilada) quando a célula avança para o ponto R (esse ponto representa um momento no qual a célula compromete-se, de modo irreversível, a completar o ciclo celular ou, alternativamente, permanecer na fase G₁ e possivelmente recuar do ciclo celular ativo para G₀) rumo à fase S. Após a mitose, a fosfatase proteína fosfatase tipo 1

(PP1) desfosforila pRB e assim a célula está pronta para um novo ciclo celular. Se a célula é submetida a estresse nas fases S ou G₂, a fosforilação de pRB pode ser revertida por fosfatases e, com isso, retornar ao seu estado de inibição de crescimento ativo. A reativação da inibição do crescimento mediada por pRB é presumivelmente somente transitória e será revertida após a parada da fonte de estresse e/ou resolução do dano, e uma vez que pRB é a proteína que decidirá entre a divisão ou não da célula, sua fosforilação deve ser cuidadosamente controlada. Esta função é realizada por componentes que regulam o ciclo celular (como as ciclinas D e a ciclina E). A hipofosforilação/hiperfosforilação acontece por meio da ligação ou liberação dos fatores de transcrição E2F associados a promotores de genes que conduzem a célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular (WEINBERG, 2008; HULLEMAN, 2005).

3.5 A Matriz Extracelular (ECM) e as Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

3.5.1 A Matriz Extracelular

Uma grande quantidade do volume dos tecidos é ocupada por uma rede complexa de macromoléculas que compõem a matriz extracelular. Esta matriz é constituída por uma ampla variedade de proteínas e polissacarídeos secretados pelas células adjacentes, formando uma rede organizada (BELLAIL *et al.*, 2004).

A matriz extracelular é composta por duas principais classes de macromoléculas: (1) as cadeias polissacarídicas de glicosaminoglicanos (GAGs), que ligam-se normalmente a proteínas de maneira covalente na forma de proteoglicanos, e (2) as proteínas fibrosas, que incluem colágeno, elastina, fibronectina e laminina e possuem funções adesivas e estruturais.

Sabe-se que a matriz exerce um papel complexo na regulação do comportamento das células, podendo influenciar seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função. A matriz contém uma grande e admirável diversidade de formas, cada uma adaptada às necessidades funcionais de um determinado tecido, devido à variação nas quantidades relativas dos diferentes tipos de matrizes biomoleculares e o modo pelo qual estes componentes estão organizados. A ECM

possui função reguladora de vários processos de sinalização celular mediados pela interação célula-matriz, pois os domínios formadores das proteínas componentes da ECM podem ligar-se à receptores de adesão celular, como por exemplo, as integrinas, que medeiam a adesão célula-matriz e realizam transdução de sinal ao interior das células. Algumas proteínas solúveis da ECM podem ainda interagir com fatores de crescimento também solúveis e regular sua distribuição, ativação e apresentação às células (revisado por HYNES, 2009).

A ECM é responsável por uma grande porcentagem da massa cerebral, e contém em sua grande maioria hialuronanas e proteoglicanos, mas também possui condroitin sulfato, heparan sulfato e dermatan sulfato. No SNC, a matriz extracelular possui importantes funções na modulação da migração de precursores gliais e neuronais, guia o crescimento dos cones axonais e formação da sinapse, assim como a proliferação celular. Em processos normais de reparo, assim como em tumores cerebrais primários, a ECM está presente em maior quantidade e sofre remodelamento. Mudanças na composição da ECM também estão relacionadas à modulação do crescimento tumoral, proliferação das células tumorigênicas e invasão por diversos mecanismos (BELLAIL *et al.*, 2004).

3.5.2 As MMPs

A renovação controlada das macromoléculas da matriz extracelular é crucial para uma grande variedade de processos fisiológicos, como por exemplo, na involução do útero após o nascimento. Esse processo é realizado por um grupo de endopeptidases dependentes da ligação dos íons Zn^{2+} ou Ca^{2+} para a sua atividade, as chamadas metaloproteinases de matriz, ou MMPs. Porém, estas enzimas também estão relacionadas a processos patológicos, como por exemplo, à migração de células tumorigênicas dos seus sítios de origem até outros órgãos, podendo contribuir no processo de metástase (ITOH & NAGASE, 2002; RAO, 2003; TAKINO *et al.*, 2004). Níveis aumentados dessas enzimas são detectados em vários tipos de tumores, muitas vezes correlacionado com a progressão maligna dos mesmos (VISSE & NAGASE, 2003; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). Durante o curso de degradação da ECM, MMPs também são responsáveis por mobilizar e ativar certos fatores de crescimento que têm sido mantidos na forma inativa na ECM ou superfície celular, estimulando assim a proliferação celular (WEINBERG, 2008).

As metaloproteínas de matriz são uma família multigênica de proteínas constituída por 23 membros divididos em cinco subgrupos de acordo com seu substrato: Colagenases – ativas contra colágenos fibrilares; Gelatinases – altamente ativas contra colágenos desnaturados; Estromalinas – degradam componentes não colágenos; Matrilisinas – caracterizadas pela ausência do domínio hemopexina e as metaloproteínas de membrana (MT-MMPs) – que são moléculas transmembrana (MENG *et al.*,2008; NAGASE; VISSE; MURPHY 2006; RAFFETTO & KHALIL, 2008). Conjuntamente, as MMPs são capazes de degradar quase todos os elementos da matriz e moléculas de adesão de superfície celular, como caderinas e integrinas..

A estrutura e domínios das enzimas MMPs estão representados na figura 3.

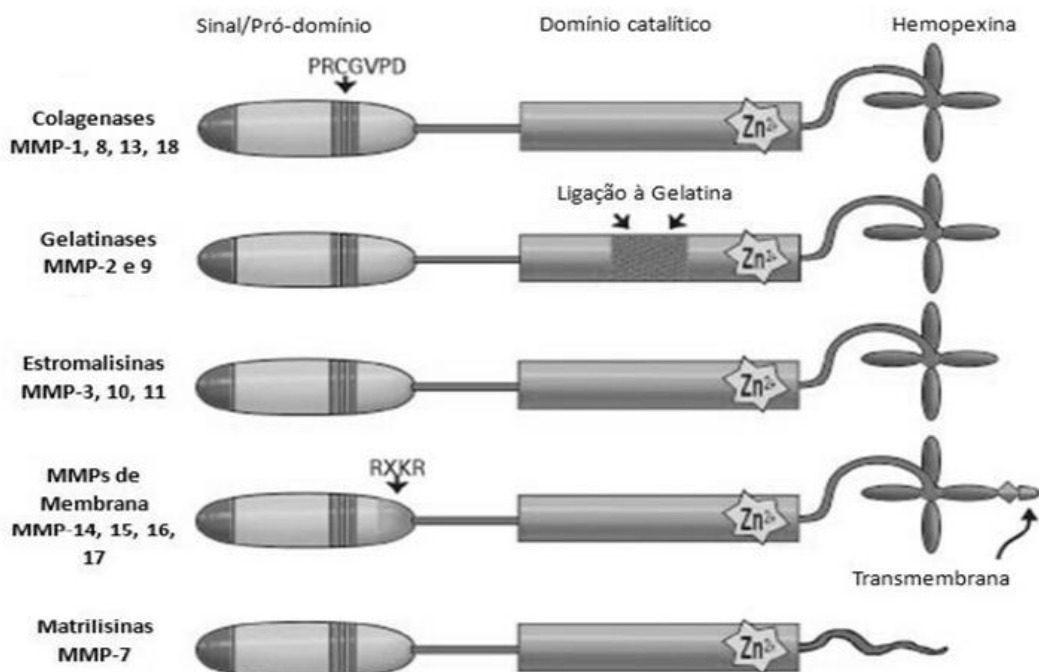


FIGURA 3: DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS MMPs. O pró-domínio contém uma sequência altamente conservada que possui um resíduo de cisteína, com o qual ocorre a interação com o sítio ativo contendo Zn^{2+} , que mantém a enzima em estado latente. O domínio catalítico das gelatinases contém três repetições do domínio de ligação à gelatina da fibronectina tipo II. O domínio hemopexina possui estrutura dobrada em quatro "lâminas" características, sendo que algumas MMPs também possuem um domínio transmembrana ligado ao domínio hemopexina (VU e WERB, 2000).

As MMPs são sintetizadas como pró-enzimas (zimogênios) e secretadas pelas células locais como pró-MMPs. A ativação desses zimogênios se dá pelo processamento proteolítico realizado por outros componentes da família das MMPs (auto-processamento proteolítico), que retiram o pró-peptídeo amino-terminal causando a ruptura da interação $Cys-Zn^{2+}$, que permite que a molécula de água

necessária para quebra da ligação peptídica durante a ação da enzima se ligue ao Zn^{2+} , deixando a enzima na sua forma ativa (NAGASE & WOESSNER, 1999).

Geralmente, as MMPs podem ser reguladas de várias maneiras: controle da transcrição gênica, ativação dos zimogênios, interação com componentes da ECM ou pela inibição direta de sua atividade enzimática, podendo ser realizadas por seus inibidores tissulares clássicos (solúveis), as TIMPs ou por outras proteínas, como por exemplo: RECK (VISSE & NAGASE, 2003).

É importante ressaltar que diferentes drogas são capazes de modular a ação de MMPs, como é o caso das estatinas, descritas por atuarem na modulação das MMPs em diversos tipos celulares, inativando, entre outras, a via RhoA/ROCK (LI *et al.*, 2008; PORTER *et al.*, 2004; TURNER *et al.*, 2005).

3.5.2.1 MMPs e Gliomas

Os gliomas são tumores que possuem uma alta capacidade invasiva principalmente em torno do parênquima cerebral, mais especificamente ao redor da substância branca, e isso se deve na maior parte à ação das MMPs (PARK *et al.*, 2008). Vários autores têm demonstrado um alto nível de MMPs em gliomas, tanto protéico como mRNA (demonstrado na figura 4, abaixo) particularmente das gelatinases MMP2 e MMP9 e também da MT1-MMP (também chamada de MMP14) (NAKADA *et al.*, 2003; CHINTALA *et al.*, 1999). Além do processo de invasão, as MMPs em conjunto com outras proteases (por exemplo, serinoproteases e cisteínoproteases), degradam a matriz e auxiliam o processo de angiogênese, bem característico de tumores cerebrais (LAKKA *et al.*, 2005).

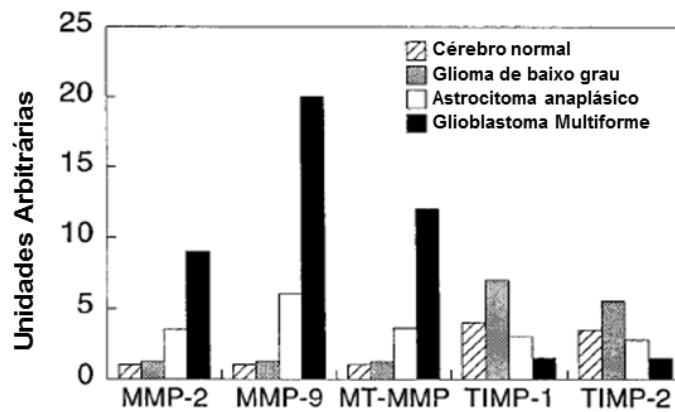


FIGURA 4: EXPRESSÃO DE MMPs E TIMPs NOS VÁRIOS NÍVEIS DE MALIGNIDADE DE GLIOMAS. Os valores de unidades arbitrárias foram geradas pela quantificação do gel de *Northern Blotting*. FONTE: Modificado de CHINTALA *et al.*, 1999.

As metaloproteinases de matriz que possuem um domínio transmembrana não são secretadas como as outras MMPs, e esta localização na superfície celular leva a formação de áreas focais onde essas moléculas encontram-se mais concentradas, reforçando assim a proteólise pericelular em áreas específicas do cérebro (FILLMORE *et al.*, 2001). Deste grupo, a MT1-MMP é mais estudada e recentemente foi descoberto que células transformadas possuem regiões de membrana ricas em MT1-MMP, conhecidos como “invadopódios”, que acentuam a degradação de ECM naquele local, abrindo caminho para as demais células tumorais invadirem outros sítios anatômicos (POINCLOUX *et al.*, 2009).

A razão entre MMPs e TIMPs é essencial para a disseminação das células de glioma (PLANCHENAUT *et al.*, 2001). Nakada e colaboradores em 2001 observaram um nível mais elevado de produção de TIMP1, mas não de TIMP2, em glioblastomas. E esse perfil repete-se em diversos tipos de tumores humanos, incluindo o de endométrio, estômago, tireóide e carcinomas orais. Outros autores têm demonstrado a atividade de MMP2, mesmo na presença abundante de TIMP1 (SHIMADA *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 1999). De outro modo, são encontrados resultados contraditórios sobre a expressão de TIMP2 em gliomas. Alguns autores evidenciaram um baixo nível de expressão de mRNA em glioblastomas, mas outros não constataram nenhuma correlação entre a expressão de TIMP2 e o grau de malignidade do tumor (NAKADA *et al.*, 2001). Entretanto, dados obtidos por Hoshi e colaboradores (2000), demonstram uma diminuição na invasividade em células de glioma humano (U87MG) após a superexpressão de TIMP2, e NAKADA e colaboradores em 2003 demonstraram que um nível baixo de produção de TIMP2 correlaciona-se com pequena sobrevida em pacientes com glioblastoma. Em nosso

laboratório, Amstalden em 2011 observou que o tratamento das células de glioma humano U87MG e U373MG com o flavonóide quercetina promoveram um aumento da razão Inibidores/MMP2 a nível de mRNA. Essa análise mostrou que o tratamento com quercetina (nas doses de 25 e 50uM por 48 horas) favoreceu o balanço proteolítico em favor dos inibidores TIMP1, TIMP2 e RECK, culminando na diminuição da atividade de MMP2, demonstrando também que o tratamento com quercetina promove uma diminuição da migração celular dose-dependente.

Hagemann e colaboradores em 2012 publicaram um estudo compilando o papel da grande maioria das MMPs em modelo de glioma. Vale ressaltar desse estudo que MMP2 é expressa tanto em tecido normal, quanto em tumores de baixo e alto grau, sendo expressa em maior quantidade em tumores de alto grau. Já MMP9 é pouco expressa em tumores de baixo grau e em tecido cerebral normal, mas é muito expressa em tumores de alto grau. Essas duas gelatinases parecem ter um papel fundamental na invasão de gliomas, visto que no painel de expressão de 16 tipos diferentes de MMPs em 33 pacientes, estas são as que mais se destacam com uma maior expressão conforme o aumento da malignidade. Já nas linhagens utilizadas neste estudo (U87MG e T98G – ambas GBM), a expressão e atividade de MMP2 já é muito bem caracterizada, porém a expressão de MMP9 ainda é controversa, como relatado em alguns estudos, onde alguns autores detectam a sua presença, e outros detectam pouco ou nada.

3.6 Inibidores de MMPs

3.6.1 TIMPs

Quatro tipos diferentes de TIMPs foram descritas e caracterizadas até hoje, sendo o conjunto das 4 capazes de inibir todas as MMPs ativas já conhecidas. As 4 TIMPs de mamíferos possuem algumas similaridades, mas apresentam algumas diferenças estruturais, bioquímicas e de expressão, sugerindo que cada TIMP deve ter um papel específico *in vivo* (BAKER *et al.*, 2002).

TIMPs são proteínas pequenas, de 21 à 28 kDa. A maior parte das ações biológicas das TIMPs deve-se ao seu domínio N-terminal, mas já foi visto que seus

domínios C-terminal podem interagir com os domínios catalíticos de algumas MMPs, como o domínio hemopexina da MMP2 e 9 (BAKER *et al.*, 2002; BREW *et al.*, 2000). As quatro TIMPs conhecidas possuem 40% de similaridade de seqüência e suas estruturas são estabilizadas por 3 pontes dissulfeto (BREW & NAGASE, 2010).

As TIMPs normalmente são secretadas, mas também podem encontrar-se formando complexos com MMPs na superfície celular, por exemplo, as TIMPs 2, 3 e 4 podem associar-se à MT1-MMP, que é ancorada à membrana celular (BREW & NAGASE, 2010). Já a TIMP3 é capaz de formar complexos com moléculas da matriz extracelular, como heparan sulfato e condroitin sulfato (YU *et al.*, 2000).

TIMPs possuem um papel dual, pois além de inibir a ação das enzimas MMPs, podem atuar na sua ativação (BODE *et al.*, 1999; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). Um exemplo é a formação do complexo ternário na membrana da célula constituído por TIMP2, MT1-MMP (também conhecida como MMP-14) e pré-pro-MMP2. Nesse complexo, a proteína TIMP2 ligada à MT1-MMP faz a desestabilização da pré-pró-MMP2, enquanto que outra molécula de MT1-MMP cliva o pré-pro-peptídeo, formando a pró-MMP2, que sofre então uma autólise liberando a MMP2 ativa (STRONGIN *et al.*, 1995).

	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4
Tamanho (kDa)	28	21	24/27	22
Localização	Solúvel	Solúvel/Membrana celular	Matriz Extracelular	Solúvel/Membrana celular
Associação com Pró-MMPs	Pro-MMP9	Pro-MMP2	Pro-MMP9/2	Pro-MMP2
Inibe Fracamente	MT1, 2, 3, 4 e 5-MMP; MMP19	nenhuma	nenhuma	nenhuma
Tumorigênese	Inibe	Inibe	Inibe	Inibe
Angiogênese <i>In vivo</i>	Aumenta em tumores de mama e inibe em tumores de fígado	Inibe em tumores de mama e melanomas	Inibe em melanomas	
Angiogênese <i>in vitro</i>	Sem efeito	Inibe	Inibe	Inibe

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DAS TIMPs ENCONTRADAS MAMÍFEROS. Modificado de: (BAKER *et al.*, 2002).

As TIMPs são responsáveis por outras atividades biológicas independentes da inibição de MMPs. Já foi comprovado que altos níveis de TIMP2 e 3 promovem a apoptose em diversos tipos celulares atuando em receptores de morte celular, mas esses efeitos ainda não estão bem elucidados (BAKER *et al.*, 2002). Elas ainda são capazes de promover a proliferação celular e são antiangiogênicas (BREW & NAGASE, 2010).

As TIMPs inibem as MMPs numa razão de 1:1, onde TIMP1 inibe a maioria das MMPs, mas inibe fracamente MT-MMPs. TIMP2, 3 e 4 inibem todas as MMPs conhecidas. A MMP2 é inibida de maneira muito forte pelas TIMPs 1, 2 e 4, mas entre todas as TIMPs, a TIMP3 possui o espectro de inibição mais amplo (NAGASE & MURPHY, 2008). A TIMP1 inibe de maneira fraca somente a MMP16, TIMP2 e 3 inibem de maneira muito eficaz as MMPs de membrana, e a TIMP3 inibe muito fortemente a MMP9. Já TIMP4 parece ser um inibidor forte de todas as MMPs (revisado por HAGEMANN, 2012).

O mecanismo geral de inibição das TIMPs baseia-se na cisteína conservada em seu domínio N-terminal que interage com o átomo de zinco presente no domínio catalítico nas MMPs. A chave deste mecanismo é a coordenação bidentada entre o íon metálico das MMPs, o grupamento α -amino do domínio N-terminal e o grupamento carbonila da cisteína conservada das TIMPs, o que retira da enzima a molécula de água necessária para a hidrólise da ligação peptídica. O resíduo 2 presente em todas as TIMPs de vertebrados (treonina ou serina) interage com a região que garante a especificidade do substrato presente nas MMPs. Os resíduos 3-5 das TIMPs ainda interagem com o domínio catalítico das MMPs, facilitando a inibição (BREW & NAGASE, 2010).

3.6.2 RECK

O gene RECK (REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs) foi descrito por TAKAHASHI *et al.*, em 1998, através do rastreamento de uma biblioteca de expressão de cDNA de fibroblasto humano normal para genes que, quando transfectados em células NIH3T3 transformadas por v-Ki-ras, poderiam induzir a reversão do fenótipo maligno (TAKAHASHI *et al.*, 1998). O gene que

codifica para a proteína RECK encontra-se no braço curto do cromossomo 9, e sua seqüência de 87 Kb foi descrita por EISENBERG *et.al.* (2002) como contendo 21 éxons e 20 íntrons e 13 SNPs (single nucleotide polymorphisms).

A glicoproteína codificada pelo gene RECK possui 971 resíduos de aminoácidos, e peso molecular de aproximadamente 110 kDa, um esquema representando os domínios protéicos de RECK está indicado na figura 5, abaixo.

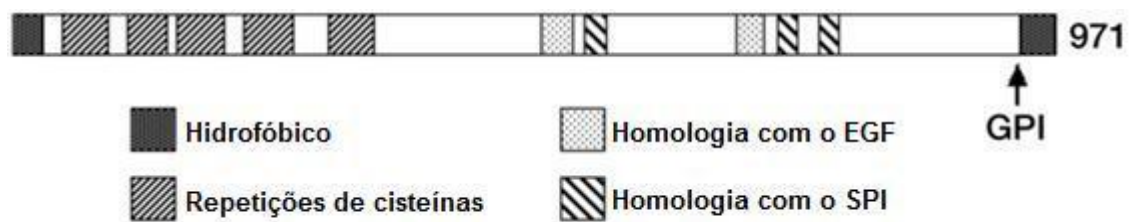


FIGURA 5: ESTRUTURA DA PROTEINA RECK. A proteína contém uma porção hidrofóbica, motivos ricos em cisteínas, regiões de homologia com o fator de crescimento epidermal, um domínio com homologia ao inibidor de serina proteases e um sinal de ancoramento GPI (glicosilfosfatidilinositol). (Fonte: Modificado de TAKAHASHI *et al.*, 1998).

RECK é uma proteína que contém vários resíduos de cisteína (cerca de 9%) e possui regiões hidrofóbicas tanto na sua extremidade NH₂ quanto na COOH-terminal. O seqüenciamento do peptídeo maduro dessa proteína quando expressa em células de mamíferos indicou que a região hidrofóbica da extremidade N-terminal serve como um peptídeo sinal e que a outra região hidrofóbica da ponta C-terminal atua como um sinal para ancoragem de glicosilfosfatidilinositol (GPI). As regiões hidrofóbicas de RECK nas duas extremidades da proteína sugerem que esta, ao ser exportada ao espaço extracelular, permaneça ligada à membrana celular pela âncora GPI (NODA *et al.*, 2003). A porção média da proteína abriga três domínios com atividade inibidora de serina proteases, sendo o primeiro em consenso com o motivo "Kazal" (C-X7-C-X6-Y-X3-C-X2,3-C). RECK também possui duas regiões com fraca homologia ao fator de crescimento epidermal (EGF) (NODA *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 1998). Evidências sugerem que RECK é recrutada para microdomínios funcionais da membrana plasmática, conhecidos como *lipid rafts*, na forma de homodímeros, e que esta localização é importante para que esta molécula exerça as suas funções (OMURA *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2011).

A proteína RECK contém cinco sítios de N-Glicosilação, que podem acarretar ativação e estabilização de proteínas, assim como a secreção para o espaço extracelular. Porém a glicosilação de RECK parece não ser necessária para sua externalização na membrana celular, mas o estado de glicosilação da molécula pode ter um papel de chave na inibição das MMPs, regulando negativamente o processo invasivo das células tumorais mediadas por essa proteína (SIMIZU *et al.*, 2005).

A principal função descrita até o momento para RECK é a inibição da atividade de metaloproteinases de matriz, especificamente, MMP2, MMP9 e MT1-MMP (OH *et al.*, 2001; SASAHARA *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 1998), as quais possuem atividade freqüentemente elevadas em vários tipos de tumores malignos. RECK é capaz de inibir a atividade de MMPs através de vários mecanismos, incluindo inibição direta da atividade protease, a regulação de sua secreção da célula, e possivelmente, através do seqüestro de MMPs na superfície celular (ver figura 6) (WELM; MOTT; WERB, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 1998; NODA *et al.*, 2003).

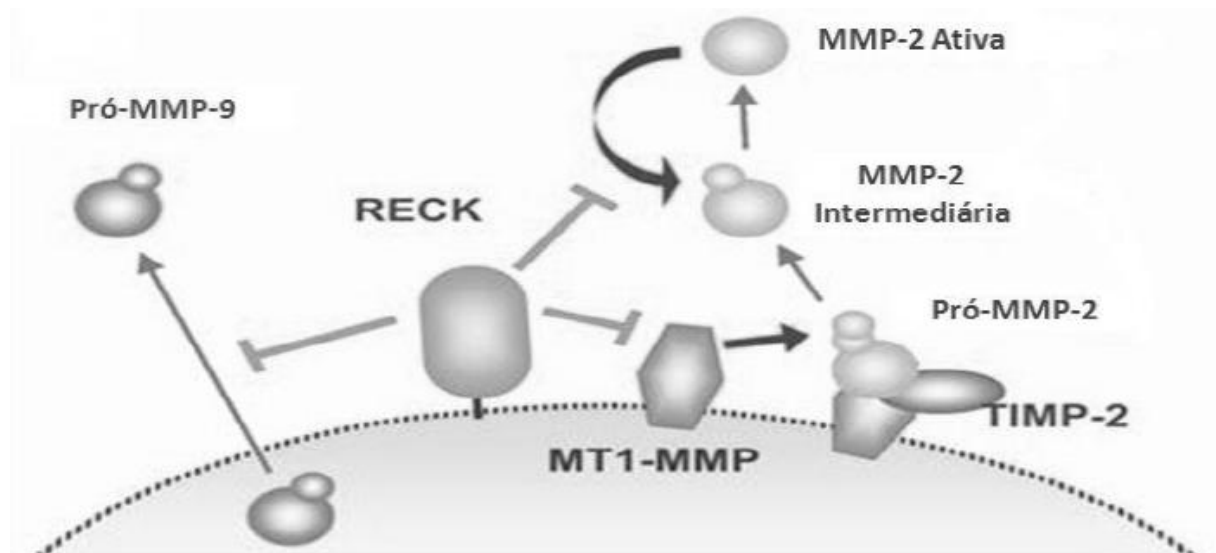


FIGURA 6: MODELO DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMPs POR RECK. A proteína RECK é associada à membrana plasmática através de uma âncora GPI. RECK é capaz de inibir a secreção e atividade da pró-MMP9 e a atividade enzimática das enzimas MT1-MMP e MMP2. NODA *et al.*, 2003.

Camundongos nocauteados para a proteína RECK morrem em torno do décimo dia da fase embrionária, com deficiências na formação e integridade das fibras de colágeno, desorganização da lâmina basal e comprometimento do

desenvolvimento vascular, levando á hemorragias. Ao realizar o nocaute adicional para MMP2, este fenótipo foi parcialmente suprimido, indicando que a regulação da atividade de MMP2 mediada por RECK possui um papel fisiológico. É importante ressaltar que a mudança na expressão de MMP2 explica apenas de modo parcial o fenótipo apresentado pelos embriões nocaute de RECK, sugerindo que outros alvos moleculares estejam envolvidos (OH *et al.*, 2001).

A expressão de RECK é reprimida por vários oncogenes, como *ras*, *fos*, entre outros, o que resulta na secreção aumentada de MMPs, que contribuem para a transformação morfológica e o comportamento invasivo das células tumorais (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Mais recentemente, diversos trabalhos mostram a expressão do gene *RECK* em tumores humanos e correlacionam com a progressão maligna e prognóstico dos pacientes. Estes trabalhos mostram que RECK é expresso em diversos tipos de tumores humanos (hepatocarcinomas, tumores de mama, de pulmão, câncer de cólon, câncer de próstata e carcinomas de pâncreas) e que, geralmente, quando seu nível de expressão é maior do que aquele apresentado pelo tecido normal adjacente, os pacientes apresentam um melhor prognóstico (FUROMOTO *et al.*, 2001; MASUI *et al.*, 2003; SPAN *et al.*, 2003; TAKEUCHI *et al.*, 2004; TAKENAKA *et al.*, 2005; RABIEN *et al.*, 2011). Portanto, a expressão de RECK aumentada está relacionada com um menor grau de malignidade e maior tempo para recidiva da doença. A expressão de *RECK* também foi avaliada durante a progressão maligna de gliomas por WINNISCHOFER (2005). Para isso foram utilizadas amostras teciduais de pacientes com astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecidos não-tumorais. Neste trabalho foi verificado que a expressão de *RECK* não é alterada conforme a progressão do tumor. Porém, entre os pacientes com os tipos mais agressivos de tumor (grau III e IV), os que manifestaram um maior tempo de sobrevida possuíam tumores com uma significativa maior expressão do gene *RECK*. De forma geral, quando a expressão de RECK é restaurada em células malignas, ocorre uma supressão da capacidade de invasão, associada ao decréscimo da secreção e transcrição de MMP9 e da atividade de MMP2 e MT1-MMP, correlacionando a expressão da proteína com a contenção da invasão e metástase tumoral (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001; NODA & TAKAHASHI, 2007; TAKAGI *et al.*, 2009). Visto que as MMPs também são necessárias para processos de angiogênese requeridos pelos

tumores, RECK também desempenha um importante papel anti-angiogênico (OH *et al.*, 2001).

Em 2011 Rabien e colaboradores relataram que a superexpressão de RECK em células de câncer de próstata reduziu em até 80% a capacidade migratória dessas células quando plaqueadas em matrigel®. Verificou-se também a modulação negativa da expressão de *RECK* no processo invasivo de gliomas humanos, sugerindo que esse processo é regulado pelo substrato de colágeno tipo I (CORREA *et al.*, 2006). Mais recentemente, CORREA e colaboradores (2010), demonstraram que a superexpressão de RECK em células de glioma humano T98G promoveu drásticas modificações no citoesqueleto celular, apresentando rearranjos dos filamentos de actina, ocasionando uma diminuição na capacidade migratória dessas células, levando à diminuição da sua capacidade invasiva. Também foi observado neste estudo que a proteína RECK está localizada predominantemente nas lamelas celulares, ou seja, à frente da migração. Vale ressaltar que o caráter invasivo das células T98G foi anteriormente associado à grande produção de enzimas do tipo MMP2 e níveis baixos de TIMPs, assim como elevada mobilidade celular (NAKAGAWA *et al.*, 1996).

Adicionalmente, foi observado que o gene *RECK* também está relacionado com progressão do ciclo celular normal em fibroblastos de camundongo, sugerindo que a regulação negativa deste gene é importante para a saída das células do estado de quiescência (fase G0 do ciclo) e progressão pelas fases G1-S do ciclo celular (WINNISCHOFER *et al.*, em fase de submissão). Este trabalho sugere que um dos possíveis mecanismos de ação de RECK, que promovem este processo, envolve a indução da expressão de um inibidor de CDK (quinase dependente de ciclina), especificamente de p21, e retardo da fosforilação de Rb. Estas evidências recentes sugerem novas perspectivas e função desta nova glicoproteína de membrana.

Mesmo que *RECK* seja um gene recentemente descrito (TAKAHASHI *et al.*, 1998), todo o conhecimento gerado até o presente momento propõe a possibilidade de utilização deste gene como marcador molecular para prognóstico em diferentes tumores e até mesmo como terapia gênica em doenças degenerativas (BAKER *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2003). Deste modo, fica claro que uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na

modulação da expressão do gene *RECK* poderá permitir o desenvolvimento de estratégias para restaurar sua expressão em células tumorais, suprimindo assim, o comportamento maligno destas células.

3.6.2.1 Transcritos alternativos de RECK

Através do conhecimento da seqüência genômica de diversos organismos tornou-se claro que a complexidade de uma espécie não é claramente refletida pelo número de genes que possui, já que 95% dos genes humanos codificam para isoformas alternativas de *splicing* (MIURA *et al.*, 2012). Através deste processo, um único gene expressa diversas proteínas relacionadas com funções diferentes, podendo ser até antagônicas (MIURA *et al.*, 2012). Transcritos alternativos ou aberrantes de pré-mRNA podem possuir um importante papel no desenvolvimento de diversas patologias, incluindo o câncer (MIURA *et al.*, 2012).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa verificou através da interface BLAT, a predição de alguns transcritos alternativos para o gene *RECK*, esquematizados abaixo:

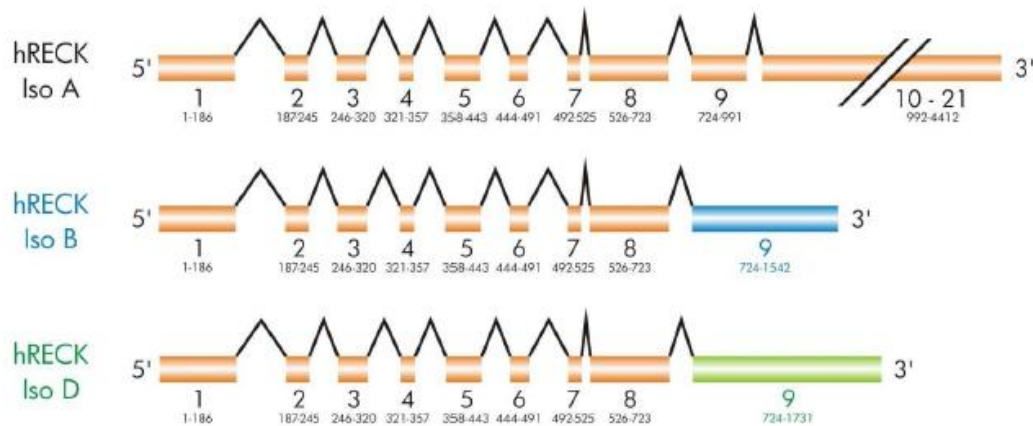


FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE RECK. O gene *RECK* pode dar origem a diferentes transcritos, distintos do transcrito canônico de 21 éxons. Estes transcritos alternativos foram preditos a partir da análise de bancos de dados de seqüências de mRNA, através da ferramenta BLAT (*BLAST-like Alignment Tool*). Os transcritos alternativos estudados neste trabalho possuem nove éxons, de forma que o nono éxon de cada um destes transcritos difere um do outro, assim como diferem do nono éxon do transcrito canônico. Sendo assim, são preditos produtos protéicos diferentes para cada transcrito alternativo. Os limites de cada éxon no mRNA estão indicados na figura (LIMA *et al.*, em fase de submissão).

A figura 8 mostra uma representação esquemática da predição protéica dos transcritos alternativos de *RECK*.

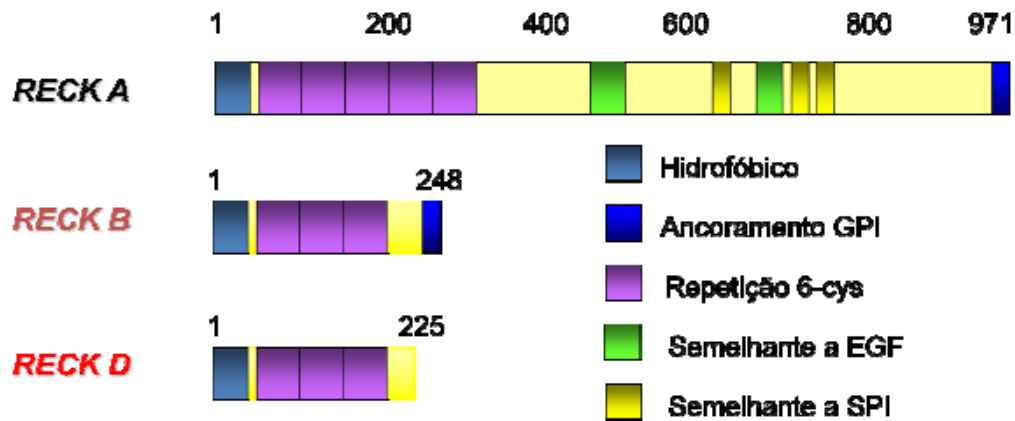


FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTÉICOS CODIFICADOS PELOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE RECK. Os produtos proteicos preditos derivados dos transcritos alternativos (RECK B e D) do gene RECK conservam algumas características da proteína canônica (RECK A), como por exemplo, a presença de âncora GPI no caso de RECK B e as repetições de cisteína. SPI indica inibidor de serina protease. GPI indica glicosilfosfatidilinositol. Cys indica o aminoácido cisteína. Os números indicam a posição dos resíduos de aminoácidos. (LIMA *et al.*, em fase de submissão).

A análise preliminar destes transcritos alternativos revela que alguns deles apresentam elevada expressão em glioblastomas humanos (este trabalho está sendo realizado em colaboração com a Profa. Mari Cleide Sogayar, Instituto de Química da USP e faz parte da tese de doutoramento da aluna Marina Trombetta Lima), sugerindo que os mesmos podem estar envolvidos no processo de progressão maligna. Os trabalhos do nosso grupo sugerem que o transcrito alternativo RECKB, o único que também codifica para uma âncora GPI, esteja correlacionado com um fenótipo invasivo. Um comportamento sempre presente em nossos estudos é a expressão antagônica do transcrito B e da isoforma canônica (denominado por nós como RECKA), pois sempre que houve um aumento ou uma tendência de aumento de RECKA, o transcrito RECKB diminuiu, e vice-versa. Jacomasso em 2010 em sua dissertação de mestrado concluiu que linhagens de melanoma metastático possuem uma maior razão na expressão de RECKB em relação à RECKA do que linhagens de baixo grau de malignidade. Estes dados de melanoma também corroboram com dados de pacientes com GBM gerados por LIMA em sua tese de doutorado, onde pacientes com glioblastoma multiforme que possuem uma maior razão RECKA em relação à RECKB são aqueles que possuem uma maior taxa de sobrevivência (dados em fase de submissão). Barbosa em 2010, em sua dissertação de mestrado, também demonstrou que o tratamento de células de melanoma humano (SK-Mel 28) com sinvastatina (nas doses de 1 e 5 μ M) foi capaz de diminuir o nível do transcrito RECKB. Ainda no nosso grupo, Amstalden em 2011

também encontrou uma diminuição significativa na expressão do transcrito alternativo RECKB em células de glioma humano U373MG após 48 horas de tratamento com 50 μ M do flavonóide quercetina.

Estes resultados ressaltam a importância da análise de *RECK* e de seus transcritos alternativos para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de transformação maligna da astroglioma.

3.7 As estatinas e sua atividade como anti-tumoral

A sinvastatina é uma droga da classe das estatinas e encontra-se dentro da classe das drogas antilipêmicas. As estatinas foram primeiramente derivadas dos fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium brevicompactum* e seu mecanismo de ação se resume através da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima responsável pela conversão do HMG-CoA a mevalonato na complexa via de síntese de colesterol (SAITO *et al.*, 2008), demonstrado na figura 9.

Especificamente, a sinvastatina é o derivado 2'-metilado da lovastatina, um composto proveniente do primeiro produto isolado dos fungos, a compactina. A sinvastatina é vendida no mercado americano desde 1992, com o nome comercial de Zocor®, e em 2007 foi o medicamento mais prescrito e utilizado nos Estados Unidos (LEVINSKI; BROWN, 2007).

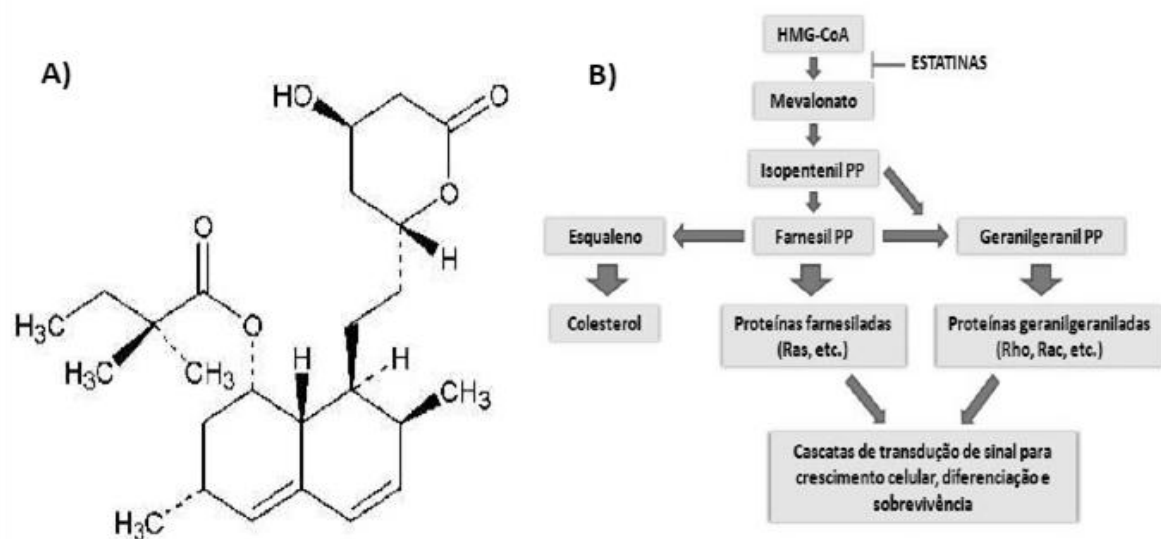


FIGURA 9: ESTRUTURA QUÍMICA DA SINVASTATINA E SUA AÇÃO NA CASCATO DE SÍNTESE DO COLESTEROL. A - Estrutura química da sinvastatina; B - Ação da droga na cascata do mevalonato, inibindo a biossíntese do colesterol, formação de isoprenóides e os processos de sinalização relacionados à prenilação de proteínas como Ras e Rho. SAITO *et al.*, 2008.

A lovastatina e a sinvastatina são convertidas nas suas formas ativas no fígado (a forma de lactona é convertida na forma ativa hidroxiácido) (CHAN, 2003). Toda a classe das estatinas é metabolizada pelo sistema do citocromo P₄₅₀. As diferenças no metabolismo das estatinas deve-se à diferente distribuição da droga no fígado, que pode ser via circulação enteropática e/ou por tecidos periféricos, via circulação sistêmica. Essa característica em conjunto com a característica lipofílica dessas drogas proporciona à lovastatina e a sinvastatina a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica e placentária, ao contrário da pravastatina e fluvastatina (American Medical Association. Drug Evaluations, 1995).

Um estudo realizado por Najib e colaboradores em 2003 mostrou que a sinvastatina utilizada na dose de 40mg/dia em pacientes com hipercolesterolemia pode alcançar concentrações plasmáticas de aproximadamente 7,2 nM. Ainda, um estudo clínico mostrou que doses de 8mg/kg/dia de fluvastatina são facilmente toleráveis por pacientes pediátricos portadores de diversos tipos de tumores (sendo 66% desses tumores do SNC), podendo os níveis plasmáticos alcançados serem ainda maiores sem efeitos colaterais importantes (LÓPEZ-AGUILAR *et al.*, 1999). Outro estudo, agora utilizando lovastatina, mostrou que utilizando 10mg/kg/dia em pacientes com tumores de cabeça e pescoço foram atingidos picos plasmáticos entre 0,5-3,5µM (KNOX *et al.*, 2001).

As estatinas estão entre os medicamentos mais utilizados no mundo principalmente por causa da sua ação antilipêmica. Devido a alta utilização, seu consumo vem sendo relacionado com uma menor incidência em diversos tipos de tumores, como de mama, coloretal, gastrointestinal, de estômago, de próstata, de pulmão, de pâncreas, de bexiga, fígado, pele não melanoma, melanoma, cânceres hematológicos e linfomas. Porém, esses estudos são bastante controversos pelo fato das estatinas estarem sendo utilizadas hoje em dia associadas à drogas que diminuem a absorção de colesterol, sendo difícil inferir a diminuição da incidência de câncer apenas às estatinas (revisado por OSMAK, 2012). Porém, um estudo recente realizado de julho de 2007 à janeiro de 2010 com 517 casos de glioma mostrou uma correlação inversa entre o uso de sinvastatina e lovastatina com a incidência de gliomas (FERRIS *et al.*, 2012).

Além da ação principal de inibição da síntese do mevalonato, e consequente diminuição nos níveis do produto final da via, o colesterol, a sinvastatina também pode atuar inibindo a formação de outros produtos, como os isoprenóides (DEMIERRE *et al.*, 2002), que podem se ligar à várias proteínas celulares permitindo a ancoragem das mesmas à membrana plasmática. Esta última ação das estatinas culmina no controle de vários aspectos celulares, como controle do crescimento e proliferação celular, bem como no processo de apoptose (COLLISSON *et al.*, 2002), desempenhando um importante papel também como agente antitumoral ao exercer efeitos antiproliferativos, anti-invasivos e pró-apoptóticos.

Alguns dos efeitos antitumorais das estatinas têm sido relacionados ao longo do tempo às proteínas Rho. As estatinas são capazes de influenciar na ação das proteínas Rho pelo fato delas necessitarem de isoprenilação pós-traducional (geranilgeranilação ou farnesilação) para manterem-se do lado interno da membrana plasmática e assim exercerem suas funções corretamente. A inibição dessas modificações pode causar o destacamento dessas proteínas da membrana e elas deixam de funcionar de maneira plena (COLLISSON *et al.*, 2002).

Outro fator que pode auxiliar no efeito anti-proliferativo das estatinas é a própria diminuição nos níveis do colesterol diretamente, visto que membranas celulares são ricas nesse tipo de molécula. Esse efeito é principalmente importante quando trata-se de tumores cerebrais, visto que as células cerebrais são separadas do colesterol presente na circulação pela barreira hemato-encefálica, sendo os níveis de colesterol depois da maturação cerebral muito estáveis, com pouca síntese *de novo* (DAVIDSON, 1965). O tecido cerebral em desenvolvimento e células tumorais requerem níveis elevados de colesterol para o crescimento celular e já foi reportado níveis aumentados da HMG-CoA nesses casos, sendo essa enzima um alvo interessante para bloquear o crescimento da massa tumoral (GLIEMROTH *et al.*, 2003).

As estatinas já demonstraram efeitos anti-invasivos *in vitro* em linhagens de tumores de mama, pâncreas, tiróide, gliomas e melanomas, e inibição da metástase em modelos *in vivo* de carcinoma de cólon, tumores de pâncreas, mama e rins, e melanoma (revisado por OSMAK, 2012). Entre todas as proteínas Rho, RhoA e RhoC parecem ter um papel importante na inibição da invasão, alterando vias como

RhoA/Rho quinase/ NF- κ B em tumores invasivos de mama e regulando negativamente genes envolvidos na invasão, como o ativador de plasminogênio uroquinase (uPA), o fator tissular (TF) e a MMP9 (DENOYELLE *et al.*, 2001) As funções anti-invasivas das estatinas ligadas às proteínas Rho também estão relacionadas à mobilidade celular, sendo responsáveis por alterações na via de RhoA/quinase de adesão focal (FAK)/AKT também em tumores invasivos de mama (DENOYELLE *et al.*, 2003). Através da inibição de RhoA e RhoB, as estatinas também diminuíram a invasão em células tumorais de pâncreas via EGF e bloquearam o aumento (mediado por TNF- α) de E-selectinas necessárias para o ancoramento das células tumorais ao endotélio (NUBEL *et al.*, 2004).

Os efeitos anti-proliferativos das estatinas são causados pela parada no ciclo celular na fase G₁-S também em detrimento da inibição da prenilação de proteínas como Ras (farnesilação) e novamente Rho (geranilgeranilação); ou por resultar no aumento dos níveis de p21 e p27, já que as proteínas Rho são importantes para a degradação de p27 (OSMAK, 2012).

No caso da indução da apoptose e dos efeitos anti-invasivos, estes parecem ser mediados pela depleção nos níveis de proteínas geranilgeraniladas, (CHAN *et al.*, 2003; DEMIERRE *et al.*, 2005). Agarwal e colaboradores em 1999 mostraram em células de câncer de cólon que a adição de geranilgeranilpirofosfato (GGPP) reverteu a indução de apoptose causada por lovastatina, enquanto a adição de farnesil pirofosfato não teve efeito nenhum. Esse estudo também mostrou que o tratamento com lovastatina diminuiu a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumentou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax.

Em relação às em MMPs, foi demonstrado que o tratamento de células HUVECs (human endotelial vein cells) com sinvastatina foi capaz de atenuar o aumento de MMP9 induzido por PMA e diminuir a razão MMP9/TIMP1 (IZIDORO-TOLEDO *et al.*, 2011).

Takeda e colaboradores em 2007 testaram a ação da sinvastatina em modelo *in vitro* de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, e observaram a inibição da atividade invasiva destas células mediada pela inativação de integrina β 1. Foi evidenciada nesse trabalho também a ativação de inibidores de

CDKs (especificamente: p21 e p27) e de proteínas envolvidos no processo de apoptose, como caspase-3.

Em células de glioma de rato, foi observado que a sinvastatina causa diminuição da fase S, acúmulo de células em G0/G1 (dose de 2,5 μ M) e um aumento dose-dependente de células em G2/M nas maiores concentrações (10 μ M) (SOMA *et al.*, 1994; SOMA *et al.*, 1995). Ainda nesse modelo, foi vista a ativação de caspases e subsequente morte por apoptose após o tratamento com sinvastatina na dose de 6 μ M (MISIRKIC *et al.*, 2011). Outro trabalho mostra um aumento de necrose em tumores ectópicos de rato (GL-26), um aumento de apoptose *in vivo* e uma diminuição da capacidade de formação de vasos em HUVECs induzida por VEGF após o tratamento com sinvastatina (BABABEYGY *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostram que o tratamento de linhagens de glioblastoma humano com sinvastatina promove parada de proliferação, alteração na migração celular e indução de apoptose, por mediar, entre outras, a via de sinalização PI3K/Akt/caspase-3 (WU *et al.*, 2009). Nesse caso, a sinvastatina suprimiu a fosforilação de AKT, induziu a translocação de Bax para a mitocôndria, ocasionando a liberação do Citocromo C, e aumentou a ativação de caspase-3, levando à apoptose. Ainda neste trabalho, o autor demonstrou que o tratamento das células de glioma humano com 10 μ M de sinvastatina ocasionou a disrupção dos *lipid rafts*, diminuindo significativamente a quantidade de colesterol e caveolina, e aumentando a concentração de Fas nessas regiões; o trabalho correlaciona as alterações na localização Fas à apoptose nessas células através da inibição da via PI3k/AKT.

Sabe-se que os *lipid rafts* são microdomínios da membrana celular ricos em colesterol e esfingolipídios, sendo responsáveis por diversos papéis na transdução de sinais celulares, servindo como plataformas de sinalização pró ou antiapoptótica (GEORGE & WU, 2012). Visto que na maioria dos casos a função das proteínas ali localizadas depende imensamente da sua associação aos *lipid rafts*, muitas vias de sinalização podem ficar comprometidas com sua disrupção (GEORGE & WU, 2012). Já foi comprovado que a mevastatina foi capaz de causar estímulos pró-apoptóticos através da disrupção dos *lipid rafts* em queratinócitos HaCaT, por intermédio de Fas (BANG *et al.*, 2005). Zhang também em 2005 concluiu que a sinvastatina (dose de 20 μ M) foi capaz de diminuir a quantidade de colesterol nos *lipid rafts*, inibindo a via de AKT/PKB, induzindo a apoptose em células tumorais de próstata. Esse fenótipo

foi revertido adicionando colesterol à cultura. Nesse estudo, também foi testado a adição de colesterol exógeno em cultura de células epiteliais de próstata normais, e o aumento desses níveis potencializou a ativação de Akt, que ficaram resistentes ao efeito pró-apoptótico da sinvastatina.

Foi observado ainda em modelo de glioma humano (nas linhagens GaMG e U87MG) a diminuição da migração de esferóides, assim como diminuição do seu tamanho e proliferação das células periféricas após o tratamento com sinvastatina (GLIEMROTH *et al.*, 2003).

Já foram realizados diversos testes clínicos utilizando as estatinas como único quimioterápico, e nesses testes os resultados não foram tão satisfatórios. Dado este fato, alguns autores começaram a associar o uso de estatinas com alguns quimioterápicos bastante utilizados na clínica, e esses resultados surpreenderam muito, pois a associação promoveu um aumento do efeito do quimioterápico em 35 dos 41 estudos (Revisado por OSMAK, 2012). Muito recentemente, alguns testes clínicos foram realizados utilizando as estatinas como adjuvantes, e 6 dos 8 trabalhos mostraram melhoras significativas em pacientes portadores de tumores como carcinoma hepatocelular, leucemia mielóide aguda, tumores cerebrais em crianças, câncer colorretal metastático e mieloma (revisado por OSMAK, 2012).

Estes resultados sugerem um grande potencial das estatinas no tratamento e prevenção também para glioma e justificam a exploração mais detalhada do mecanismo intracelular desse efeito, buscando desvendar novos alvos moleculares envolvidos no processo de tumorigênese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedimentos em cultivo celular

4.1.1 Esterilização dos materiais

Todos os materiais e vidraria utilizados para os procedimentos de cultivo de células (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiras plásticas para pipetas automáticas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave da marca Fanem a 120°C, durante 45 minutos e sob pressão de 1 atm. Após o processo de esterilização, o material foi colocado para secar em estufa Fanem (Modelo Orion 505) a 50°C.

4.1.2 Soluções e meio de cultura

4.1.2.1 Solução salina tamponada (PBS)

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) é constituída por 680 mmol/L de NaCl, 13,4 mmol/L de KCl e 40,5 mmol/L de Na₂HPO₄ (pH 7.4), sendo esterilizada em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente ou a 4°C.

4.1.2.2 Solução de tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA é constituída de 137 mmol/L de NaCl, 5,4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na₂HPO₄, 0,44 mmol/L de KH₂PO₄, 2,3 mmol/L de NaHCO₃, 0,53 mmol/L de EDTA e 50 mg/% de tripsina, com o pH ajustado para 7,4. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em

câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a -20°C .

4.1.2.3 Solução de sinvastatina

A solução estoque de sinvastatina, Zocor® da MERCK, foi preparada na concentração de 0,1M, diluída no veículo da droga, o etanol, e armazenada a temperatura de -80°C . Foram utilizadas ao longo deste trabalho as concentrações de 1 e $5\mu\text{M}$, onde os controles sempre foram feitos com a mesma concentração de etanol 100% estéril utilizada para o tratamento de $5\mu\text{M}$ da sinvastatina.

4.1.2.4 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (PI)

A solução desnaturante de iodeto de propídeo foi preparada em 20 mL de PBS utilizando 50 $\mu\text{g/mL}$ de PI (estoque: 1 mg/mL de água ultra-pura); 0,1% m/v de citrato de sódio; 0,1% v/v de Triton X-100; 0,1% de RNase A (solução estoque de 10 mg/mL), armazenada à -20° . O armazenamento foi à 4°C ao abrigo da luz.

4.1.2.5 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio DMEM alta glucose (Cultilab), reconstituído em água ultra-pura e com pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio foi feito pela adição de NaHCO_3 estéril (autoclavado) e o tamponamento do meio foi realizado utilizando HEPES esterilizado por filtração em membrana de aceto-nitrato de celulose com poro de $0,22\ \mu\text{m}$. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de celulose com poro de $0,22\ \mu\text{m}$ sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio DMEM alta glucose foi suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB – Cultilab) e 50 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico gentamicina.

4.2 Linhagens celulares

U87MG: Já foi utilizada em mais de 1700 publicações ao longo de 40 anos e teve seu genoma seqüenciado em 2010, sendo sua principal mutação no gene PTEN (CLARK *et al.*, 2010). Essa linhagem originou-se segundo a ATCC (American Type Culture Collection) de um homem, caucasiano com 44 anos. Possui característica epitelial, cresce aderente ao substrato e é hipodiplóide. É capaz de formar tumores *in vivo* em camundongos imunodeprimidos.

T98G: Linhagem de alta invasividade, com característica epitelial e cresce aderida ao substrato. Também segundo a ATCC (American Type Culture Collection), É originaria de um homem, caucasiano com 61 anos de idade. Possui característica genética hiperpentaplóide. Sua capacidade de formar tumores *in vivo* é controversa.

4.2.1 Condições de cultivo

In vitro, as células de glioma desenvolvem-se como culturas aderentes cultivadas em garrafas de poliestireno estéreis. Às garrafas foram adicionados o meio de cultura (DMEM alta glucose) suplementado com 10% de SFB e antibiótico. As células foram mantidas em estufa da marca Sanyo sob atmosfera contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as da garrafa e realizar o repique. Para o armazenamento das linhagens, aproximadamente 10⁷ células/mL foram ressuspensas em meio de cultura suplementado com 10% SFB e 5% de DMSO e armazenadas em freezer à -80°C.

4.3 Ensaio para análise de viabilidade celular através do método de MTT

As duas linhagens foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de SFB, totalizando 1,5x10⁴ células/poço e foram deixadas 24 horas para adesão. As células foram tratadas no controle utilizando-se apenas o veículo da droga, o etanol na concentração correspondente a 5µM, e 1 e 5 µM de sinvastatina por 24, 48 e 72 horas. Após o

tempo de tratamento, foi retirado o meio de cultura e adicionado 900 μL da solução de HBSS e 100 μL da solução de MTT em HBSS na concentração de 5mg/mL. As placas foram mantidas em estufa à 37°C em uma atmosfera de 5% CO_2 durante 3 horas, protegidas da luz. Passado o tempo, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan dissolvidos em 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido). A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TECAN Infinite 200) utilizando filtro de 540 nm. Os resultados foram calculados à partir dos valores médios da absorbância das triplicatas experimentais e expressos em porcentagem do cristal de formazan formado em relação ao controle (considerado como 100%).

4.4 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Cada linhagem celular foi plaqueada em placas de 12 poços numa quantidade de 5×10^4 em meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de SFB mais gentamicina. As células foram tratadas com as concentrações de 1 e 5 μM de sinvastatina por 48 horas, utilizando o etanol (concentração referente à 5 μM como controle). A seguir, o sobrenadante foi coletado, as células foram lavadas com PBS, que também foi coletado, e após a tripsinização, a suspensão de células foi adicionada ao tubo falcon de 15mL que já continha sobrenadante e o PBS da lavagem. Durante todo o procedimento de coleta, as amostras foram mantidas à 4°C. Após isso, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 1mL PBS duas vezes para que fosse retirado o excesso de meio de cultura. As células então foram coradas com 300 μL de uma solução hipotônica desnaturante de iodeto de propídeo descrita acima. O tempo de incubação foi de 30 minutos. O conteúdo de DNA de cada amostra foi analisado utilizando um Citômetro de Fluxo (BD FACScalibur), totalizando 10.000 eventos por amostra. Todos os experimentos independentes foram feitos em duplicata. O tamanho das células foi avaliado pela amplificação linear por FSC (Forward Light Scatter) e a granulosidade foi medida por SSC (Side Ward Scatter), e os dados de fluorescência foram adquiridos no filtro FL-2A. Os dados de ciclo celular foram analisados através do programa FCS Express 4 Flow Cytometry, disponível gratuitamente por 1 mês pelo site:<http://www.denovosoftware.com/site/demo-overview.shtml>. Para a análise de DNA fragmentado foi utilizado o software WinMDI 2.9. Foi medido a quantidade de

células presentes na região anterior ao começo do pico do histograma referente a Fase G1 do ciclo celular.

4.5 Ensaio de *Scratch in vitro*

As duas linhagens de glioma humano foram plaqueadas em placas de 24 poços até atingirem a máxima confluência. Após isso o meio de cultura foi retirado, e com o auxílio de uma ponteira (*tip 200*) foi feito um risco contínuo pela superfície da placa e as células soltas foram retiradas com uma lavagem com PBS (LIANG; PARK; GUAN, 2002). Em seguida foi adicionado o meio de cultura suplementado contendo o tratamento com sinvastatina nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol/L}$ (utilizando o etanol como controle) pelo período de 24 e 48 horas. A condição controle foi feita com o veículo da droga, etanol. Nos tempos de 24 e 48 horas, foram retiradas fotos no microscópio Zeiss modelo AXIOVERT 40 CFL no aumento de 400x. As análises foram feitas medindo a largura do risco em μm em 3 campos para cada condição, utilizando o próprio software do aparelho.

4.6 Avaliação da expressão de RECK (e transcritos alternativos), MMPs e TIMPs.

4.6.1 Análise dos níveis de mRNA após o tratamento com sinvastatina

4.6.1.1 Extração e purificação do RNA celular

As células foram plaqueadas em uma densidade de $1,3 \times 10^6$ células por placa de 100mm, utilizando meio DMEM alta glucose, e incubadas por 24 horas em estufa nas condições de temperatura e atmosfera mencionadas anteriormente para que ocorresse a sua adesão nas placas. Após este tempo as células foram tratadas com as concentrações de 1 e 5 $\mu\text{mol/L}$ de sinvastatina mais o controle com etanol na concentração referente à 5 μM , e incubadas em estufa novamente durante o tempo de 48 horas. Transcorrido o tempo de tratamento, as células foram desprendidas

das placas com 500µL da solução de tripsina-EDTA, sendo adicionado cerca de 1 mL de meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino para inativação da enzima. As suspensões de células foram transferidas para tubos de centrifuga de 2mL e submetidas à centrifugação durante 3 minutos a 3.000 g. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado do tubo para não remover o *pellet* de células. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS, submetidas novamente à centrifugação por 3 minutos a 3000 g, e foi retirado cuidadosamente o sobrenadante. Os *pellets* de células foram armazenados a -80°C até a extração do RNA.

O RNA celular foi extraído utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Basicamente, a tecnologia se fundamenta na propriedade de ligação seletiva do RNA com mais de 200 nucleotídeos à membrana de sílica presente na mini-coluna. Primeiramente as células foram lisadas e homogeneizadas com o tampão RLT (β -mercaptoetanol / guanidina-tiocianato). Além da lise, este tampão inativa as RNAses presentes na amostra, deixando o RNA intacto. Foi então adicionado etanol 70%, necessário para fornecer condições adequadas para a ligação do RNA total à membrana de sílica da coluna. Após várias lavagens com diferentes tampões (RW1 e RPE) sais, metabólitos e outros debris celulares foram removidos, ficando o RNA purificado na coluna, onde o mesmo foi finalmente eluído com água livre de RNAses. O RNA extraído foi imediatamente quantificado, e aliquotado em 2 tubos de 0,6mL, cada um com de 1µg de RNA, um para a síntese de cDNA e outro para verificação de sua integridade através de gel de agarose 1%. As alíquotas foram armazenadas a -80°C. A integridade do RNA obtido foi verificada pela separação eletroforética de 1µg de RNA em um gel de agarose 1%. Foram consideradas de boa qualidade as amostras que apresentaram as bandas referentes às subunidades ribossomais 28S e 18S bem destacadas e sem a presença apreciável de arraste (RNA fragmentado) ou de DNA genômico. As amostras de RNA que atenderem aos critérios citados foram armazenadas a -80 °C e utilizadas para a síntese do cDNA. A quantificação foi feita através da medida de absorbância da amostra em 260 e 280 nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific).

4.6.1.2 Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar seguiu as especificações da metodologia utilizada – ImProm II *Reverse Transcription System* (Promega), um kit convencional que inclui uma transcriptase reversa e um conjunto de reagentes projetados para uma síntese de DNA a partir de um mRNA poli (A). Detalhadamente, 1 µg de RNA total extraído foi transferido para um tubo de 0,6 mL com seu volume final ajustado para 6 µL. Adicionou-se então ao RNA 1 µL de Oligo(dT) e o tubo contendo a solução foi incubado a 70°C por 5 minutos e rapidamente foi deixado em gelo por mais 5 minutos. Após esta etapa de anelamento, foi adicionado em cada tubo 13 µL do mix para a então reação no termociclador. A mistura teve a seguinte composição:

TABELA 2: COMPOSIÇÃO DA MISTURA DE REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA.

Componente	Quantidade
Água livre de RNAses	3,5 µL
ImProm II Tampão de Reação 5x	4 µL
Cloreto de Magnésio 5 mmol/L	3 µL
Mix de dNTPs (0,5 mmol/L de cada)	1 µL
RNasin Inibidor de RNase	0,5µL = 20u
ImProm II Transcriptase reversa	1 µL

(Fonte: O Autor, 2013)

Após a adição do mix ao RNA mais o oligo dT, a síntese propriamente dita foi realizada em termociclador (Eppendorf) em 25° por 5 minutos, 42°C por 60 minutos, após a enzima será inativada a 70°C por 15 minutos. Depois de pronto o cDNA recém sintetizado foi diluído 1:10 com água livre de RNase e armazenado a -20°C.

4.6.1.3 Análise da modulação da expressão gênica

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o cDNA sintetizado como descrito no item anterior e *primers* específicos para os genes de interesse, cuja sequência está descrita na tabela abaixo.

TABELA 3: SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE qRT-PCR

Gene	Concentração	Sequência
HPRT	200 nM	Forward - GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA Reverse - TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT
HMBS	200 nM	Forward - TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT Reverse - CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC
GAPDH	400nM	Forward - ACCCACTCCTCCACCTTTGA Reverse - CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
RECKA	600nM	Forward - TGGAAAGCAATAGCTTGTTCACT Reverse - CTTTCAGCTGTGTGGTCTTCAG
RECKB	600nM	Forward - TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA Reverse - CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC
MMP2	600nM	Forward - AGCTCCCGGAAAAGATTGATG Reverse - CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT
MMP9	200nM	Forward - CCTGGAGACCTGAGAACCAATC Reverse - GATTTGACTCTCCACGCATCT
MT1-MMP	600nM	Forward - CCATGCAGAAGTTTTACGGCT Reverse - CCCAAACTTGTCTGGAACACC
TIMP1	400nM	Forward - CCGCAGCGAGGAGTTTCTC Reverse - GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA
TIMP2	600nM	Forward - CGACATTTATGGCAACCCTATCA Reverse - GCCGTGTAGATAAACTCTATATCC
TIMP3	800nM	Forward - ATCGGTATCACCTGGGTTGT Reverse - CGGTCCAGAGACACTCGTTC
TIMP4	800nM	Forward - GCCAGAAGCAGTATCTCTTGAC Reverse - AGGGCTCGATGTAGTTGCAC

(Fonte: O Autor, 2013)

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 Schmittgene 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). Os valores de CT dos genes alvo foi representada como unidades relativas de expressão, normalizados por genes de controle interno já mencionados.

4.7 Avaliação dos níveis protéicos por *Western Blotting*

As células foram plaqueadas, tratadas exatamente como no método descrito para o qPCR. Dado o tempo do tratamento foi adicionado 500µL de tampão de extração de proteínas RIPA⁺ suplementado com o coquetel de inibidores de proteases (100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/ml, 10 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇ e 4 mM EDTA) à placa de cultura, e as células foram removidas utilizando um rodinho. Os lisados foram passados 10x por uma seringa de insulina para assegurar uma melhor extração das proteínas, mantendo à partir daí tudo resfriado em gelo. As amostras foram homogeneizadas até que se tornem bastante fluidas. As amostras foram centrifugadas a 13.000 x G por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido à um novo tubo e guardado à -80°C. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford, segundo uma curva padrão utilizando BSA. Cerca de 70µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de 7,5% de poliacrilamida-SDS-PAGE e a seguir as proteínas do gel foram transferidas a para membrana de PVDF pelo método de transferência úmida. A membrana contendo as proteínas da amostra foi bloqueada em solução de 5% (m/v) de BSA em TBST (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) Tween-20) durante 1 hora. Depois de bloqueada, a membrana foi incubada com o anticorpo primário contra a molécula de interesse, na diluição e durante o tempo indicados no protocolo fornecido pelo fabricante. Após o período de ligação do anticorpo primário a membrana foi incubada com o anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, também nas condições descritas pelo

fabricante. Os anticorpos utilizados nesse trabalhos estão descritos abaixo (todos os anticorpos utilizados foram produzidos em coelho).

TABELA 4: DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE *WESTERN BLOTTING*

Anticorpo	Concentração	Marca
Anti-Flotilina	1:300	Santa Cruz
Anti-RECK	1:1000	Cell Signaling
Anti-GAPDH	1:1000	Sigma-Aldrich
Anti- IgG Peroxidase	1:10000	Cell Signaling

(FONTE: O Autor, 2013)

Para a revelação do *blotting* foi utilizado o substrato quimioluminescente da peroxidase (Sigma). As bandas foram registradas em filmes fotossensíveis (GE Healthcare). A membrana foi utilizada para detecção da proteína normalizadora. Para isto os anticorpos ligados à membrana foram removidos, incubando a membrana em uma solução de *stripping* (60 mM Tris-HCl pH 6,7, 250 µM β-mercaptoetanol, 2% (m/v) SDS) a 60 °C por 30 minutos e lavando em 5x TBST. Após isto, as etapas para a nova detecção foram as mesmos descritos anteriormente.

4.8 Zimografia em gelatina

Para a determinação da atividade de MMPs, $1,3 \times 10^6$ células foram semeadas em placas P100. Após a adesão o meio contendo soro foi retirado e a monocamada de células lavada 2x com PBS. Em seguida foi adicionado meio DMEM alta glucose e suplementado com 0,1% de soro fetal bovino com o tratamento de 1 e 5µM de sinvastatina e etanol como controle (concentração referente à utilizada na dose de 5µM) , e mantidas nas condições de cultivo descritas anteriormente. Após este período, 1 mL de meio de cultura de cada condição foi coletado e colocado à 4°C. A placa de cultura foi lavada 2x com PBS para que todas as células soltas fossem retiradas. As células aderidas foram então tripsinizadas, a tripsina foi inativada com soro fetal bovino, e as células foram contadas em câmara de Neubauer a fim de normalizar a quantidade de amostra a ser corrida no gel de poliacrilamida. A normalização foi feita de modo que o volume das amostras foi proporcional à diferença entre os números de células, visto que a sinvastatina causa

morte celular. Após isso, aos volumes de sobrenadante guardados à 4°C, normalizados, foi adicionado tampão de amostra não redutor (300mM Tris-HCl, pH 6,8; 50% glicerol; 10% SDS; 0,05% azul de bromofenol); e foi corrido um gel com as proteínas presentes neste meio condicionado em poliacrilamida 10% copolimerizada com 1% (m/v) de gelatina, em condições não-redutoras. O gel resultante foi incubado em solução 1% (m/v) de Triton X-100 durante 30 minutos em temperatura ambiente para renaturação das gelatinases. Em seguida, os géis foram incubados por 18h em tampão contendo Zn^{2+} (50mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM $CaCl_2$; 1 μ M $ZnSO_4$). Após este período, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma) e descorados em solução de ácido acético, metanol e água 1:1:8. As bandas referentes às gelatinases mostram-se claras, e o *background* azul, devido à presença de gelatina íntegra, corada pelo coomassie. Os géis foram digitalizados e a intensidade das bandas quantificada utilizando o programa ImageJ (National Institutes of Health – NIH).

4.9 Isolamento de membranas resistentes a detergente

Para a separação das membranas resistentes a detergentes, $5,3 \times 10^7$ células foram utilizadas para cada condição (controle e tratado com sinvastatina-1 μ M). O pellet foi resuspendido em 350 μ L de TNE (75 mM NaCl; 1 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl; pH 7,4) suplementado com coquetel de inibidores de proteases (CLAP-Protease Inhibitor Cocktail, da Sigma Aldrich) e homogeneizado com a seringa por 25 vezes. Esse processo garante que as células tenham suas membranas rompidas. Transfere-se 300 μ L para um novo tubo, adicionou-se 150 μ L de Triton X-100 3% em TNE/CLAP e deixa-se incubar por 30 minutos à 4°C. Esse tampão a essa temperatura específica é capaz de solubilizar os lipídios da membrana celular exceto as regiões dos *lipid rafts*, que permanecem insolúveis. Transcorrido o tempo, foi aplicado ao tubo 1,2 ml da solução de sacarose 56% em TNE, para ajustar a concentração para 41%, homogeneizando suavemente. O conteúdo foi transferido para o tudo de ultracentrífuga. Em seguida foram sobrepostas as camadas de 200 μ L do gradiente de sacarose nas concentrações de 31%, 29%, 24%, 22%, 18%, 15% e 10%. As camadas foram aplicadas suavemente para evitar a homogeneização das diferentes concentrações. Os tubos contendo as amostras e o gradiente de sacarose foi submetido à centrifugação de 45.000 rotações por minuto durante 20 horas a 4°C. Terminada a centrifugação foram retiradas cuidadosamente 13 frações de 180 μ L a

partir da camada do topo do tubo. As frações foram estocadas à -80°C para posterior *Western Blotting*.

4.10 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para a comparação entre os valores experimentais obtidos entre o controle e as duas doses de tratamento para cada linhagem, utilizou-se ANOVA com teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de p menor que 0,05. Todos os gráficos neste trabalho foram expressos como a média dos experimentos independentes \pm o desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológica

Para o ensaio de análise morfológica, as células de glioblastoma humano U87MG e T98G foram plaqueadas e tratadas com sinvastatina nas doses de 1 e 5 μ M. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração utilizada na dose de 5 μ M. O experimento foi acompanhado durante 48 horas, onde foram tiradas fotos pontuais após 24 e 48 horas de tratamento. Os resultados estão apresentados na figura 10, parte A e B, a seguir.

Foi verificado que o tratamento com a sinvastatina é capaz de alterar a morfologia das linhagens de glioma humano de uma forma bastante particular, e esse comportamento foi encontrado nos tratamentos para todos os experimentos realizados.

Podemos observar através dessas imagens geradas por microscopia óptica de contraste de fase, que as duas linhagens possuem uma morfologia bastante diferenciada uma da outra, demonstrando o quanto os tumores da glia podem ser heterogêneos. (Figura 10, parte A e B).

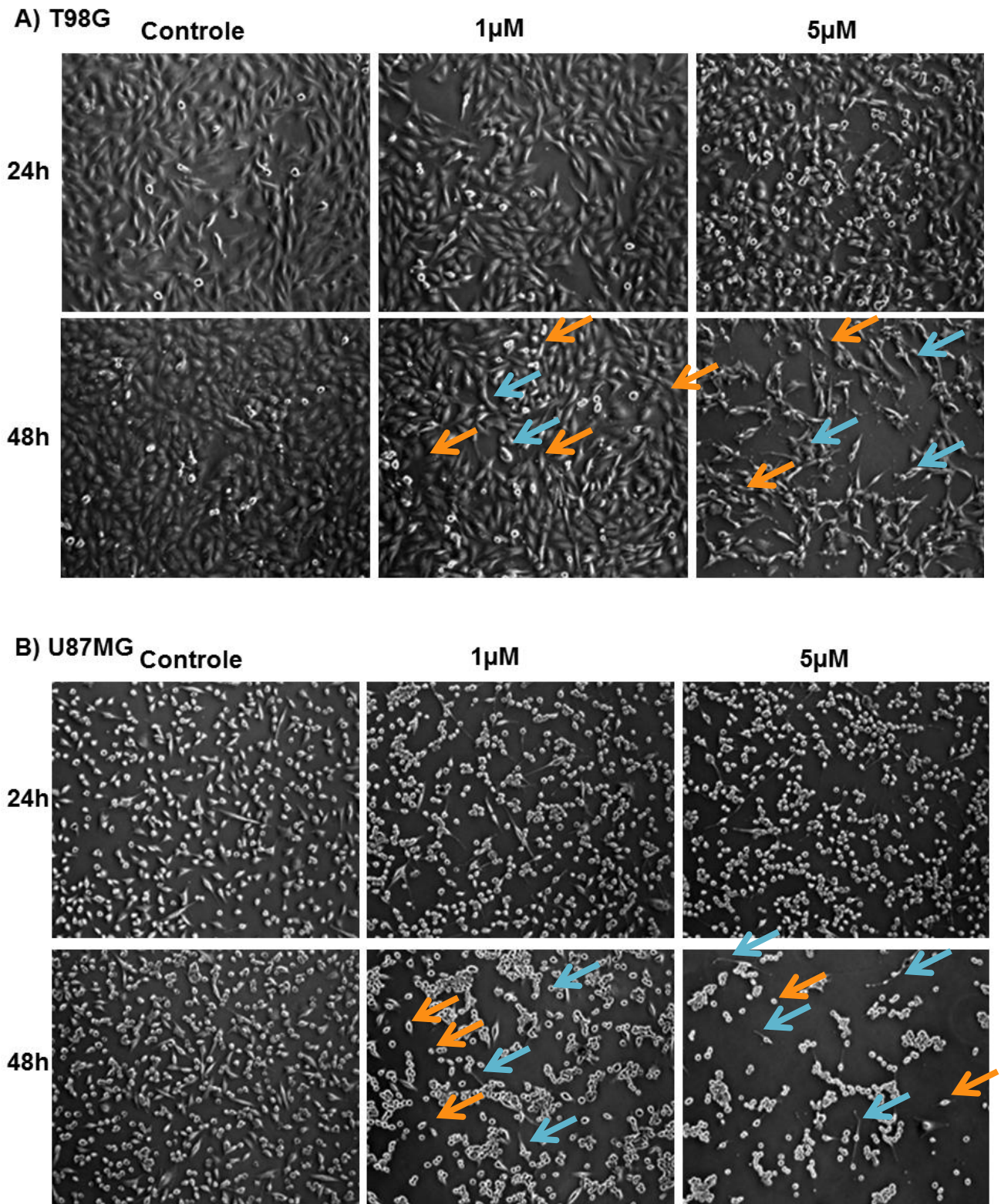


FIGURA 10: ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO TRATADAS COM SINVASTATINA. A) Linhagem T98G nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas. B) Linhagem U87MG nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas. No controle foi utilizado apenas o veículo da droga, o etanol, referente à concentração de 5 μ M. As setas alaranjadas mostram células com fenótipo arredondado, as setas azuis claras mostram os finos prolongamentos ocasionados pelo tratamento. Microscopia de contraste de fase, aumento de 50x.

Observamos que no tempo de 24 horas (Figura 10, A e B, painel superior), o tratamento com 1 e 5 μM de sinvastatina não modificou de maneira expressiva a morfologia das linhagens U87MG e T98G. Podemos ver apenas algumas células soltas na linhagem T98G na dose de 5 μM , e células um pouco mais arredondadas na linhagem U87MG, nas duas doses utilizadas.

Já no tempo de 48 horas, (Figura 10, A e B, painel inferior), podemos observar que nas duas linhagens utilizadas, principalmente na maior dose, que o substrato plástico o qual as células estavam aderidas aparece de maneira bem mais evidente, mostrando que as células soltaram desse substrato após 48 horas de tratamento. Fica bastante claro tanto a perda de viabilidade demonstrada pela desaderência das células do substrato plástico, bem como a mudança no perfil morfológico das células, que encontram-se mais arredondadas (demonstrado na figura pelas setas alaranjadas) e com prolongamentos mais finos (demonstrado na figura pelas setas azuis claras) ou muitas vezes ausentes.

5.2 Viabilidade celular

As células T98G e U87MG foram plaqueadas e tratadas com sinvastatina nas concentrações de 1 e 5 μM por diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72h). Transcorridos os tempos de tratamento, a viabilidade celular foi determinado pelo método do MTT, que avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente viáveis. As doses de 1 e 5 μM foram escolhidas com base no trabalho de mestrado da aluna Fernanda Augusta de Lima Barbosa (em sua dissertação de mestrado) por serem as doses mais utilizadas na literatura, inclusive para glioblastoma multiforme, e também porquê pacientes em tratamento apresentam níveis plasmáticos similares após a ingestão da sinvastatina (KNOX *et al.*, 2001). A Figura 11 mostra os resultados obtidos .

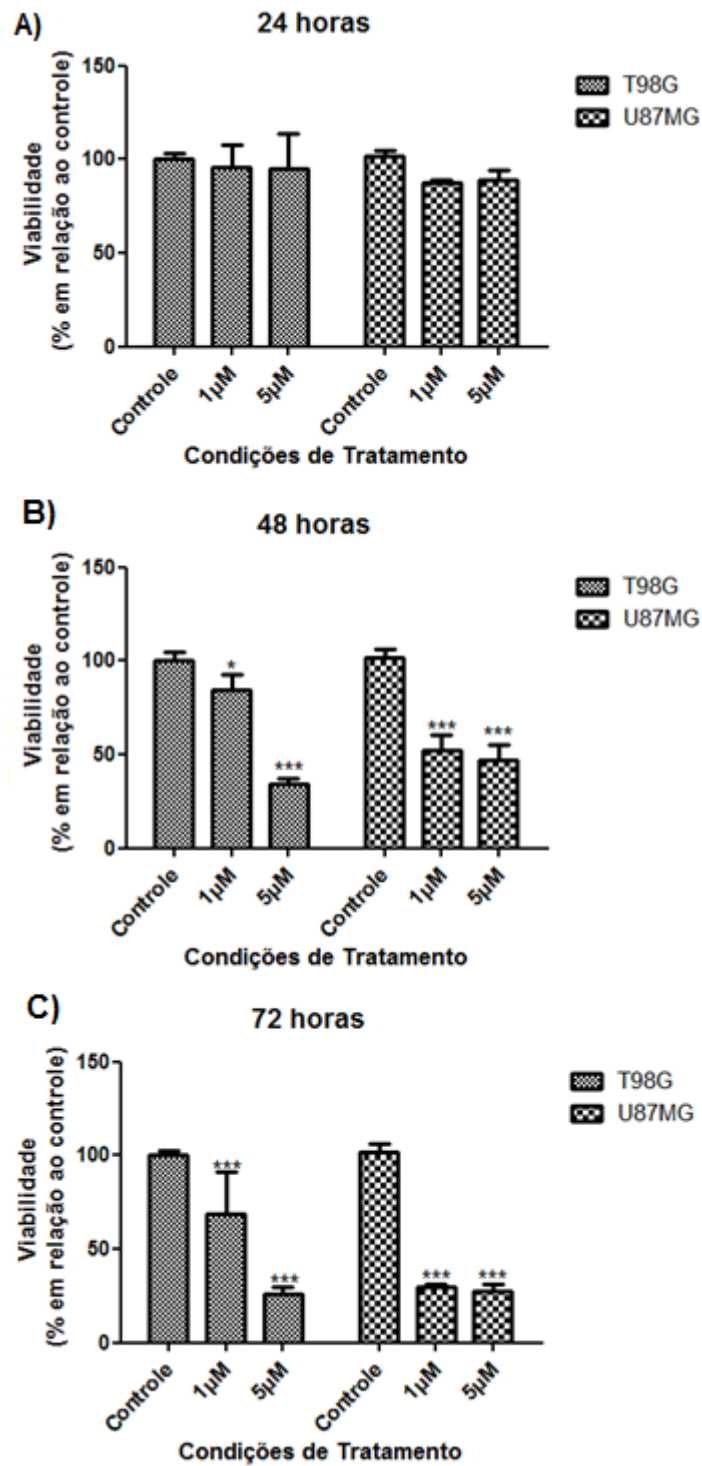


FIGURA 11: VIABILIDADE DAS CÉLULAS T98G E U87MG APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA. A) 24 horas, B) 48 horas e C) 72 horas. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração utilizada na dose de 5 μM. O resultado é representado pela média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados de significância foram obtidos sempre em relação ao controle. ANOVA com Tukey * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Pode-se observar que o tratamento com simvastatina por 24 horas (figura 11, A) não promove nenhuma alteração significativa sobre a viabilidade em ambas as

linhagens de glioma humano. Esses dados corroboram com o comportamento encontrado na análise da morfologia celular (figura 10, A e B, superior), onde não foi visto alterações morfológicas significativas após 24 horas de tratamento.

De forma geral, após 48 horas (Figura 11, B) de tratamento com sinvastatina nota-se uma diminuição significativa da viabilidade celular em ambas as linhagens de glioma humano. Especificamente, a sinvastatina na dose de $1\mu\text{M}$ foi capaz de reduzir a viabilidade em torno de 16% para a linhagem T98G e 48% para a U87MG. Já a maior dose analisada diminuiu a porcentagem de células metabolicamente viáveis em torno de 66% na linhagem T98G e 54% para a linhagem U87MG. Foi demonstrado nesse tempo de tratamento que na linhagem T98G a diminuição de viabilidade é dependente da concentração de sinvastatina utilizada (efeito dose-dependente). Em relação à linhagem U87MG, é visível que já na dose de $1\mu\text{M}$ temos uma diminuição bastante expressiva de viabilidade celular, não sendo significativamente diferente daquela observada para o tratamento com a maior dose de sinvastatina ($5\mu\text{M}$). Comparando o comportamento das duas linhagens celulares, pode-se afirmar que nesse tempo de tratamento (de 48 horas) há uma maior susceptibilidade à sinvastatina nas células U87MG, pois estas já tem um decaimento elevado da viabilidade na dose de $1\mu\text{M}$, enquanto que as células T98G tem um efeito bastante expressivo apenas na dose de $5\mu\text{M}$.

No tempo de 72 horas de tratamento, o perfil foi o mesmo do que para 48 horas, mas os efeitos citotóxicos foram ainda mais pronunciados (figura 11, C). Na dose de $1\mu\text{M}$ houve uma redução nas células viáveis de aproximadamente 32% para a linhagem T98G e 70% para a linhagem U87MG, enquanto a dose de $5\mu\text{M}$ foi capaz de reduzir em 75% a viabilidade das células T98G, e 73% nas células U87MG.

Devido à alta perda do número de células com 72 horas de tratamento, o tempo escolhido para os experimentos posteriores foi de 48 horas, onde podemos ver claramente que a droga está tendo um efeito bastante pronunciado, porém ainda resta um número de células viáveis considerável para a realização dos experimentos.

5.3 Progressão do ciclo celular.

Como observado nos experimentos de viabilidade celular, a sinvastatina é citotóxica nas concentrações utilizadas à partir de 48 horas de tratamento, tornando-se importante avaliar seus efeitos sobre as diferentes fases do ciclo celular. As duas linhagens estudadas foram plaqueadas e tratadas com sinvastatina nas duas doses escolhidas e no tempo de 48 horas. Após esse tempo, as células foram coletadas, coradas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos estão indicados nas figuras a seguir:

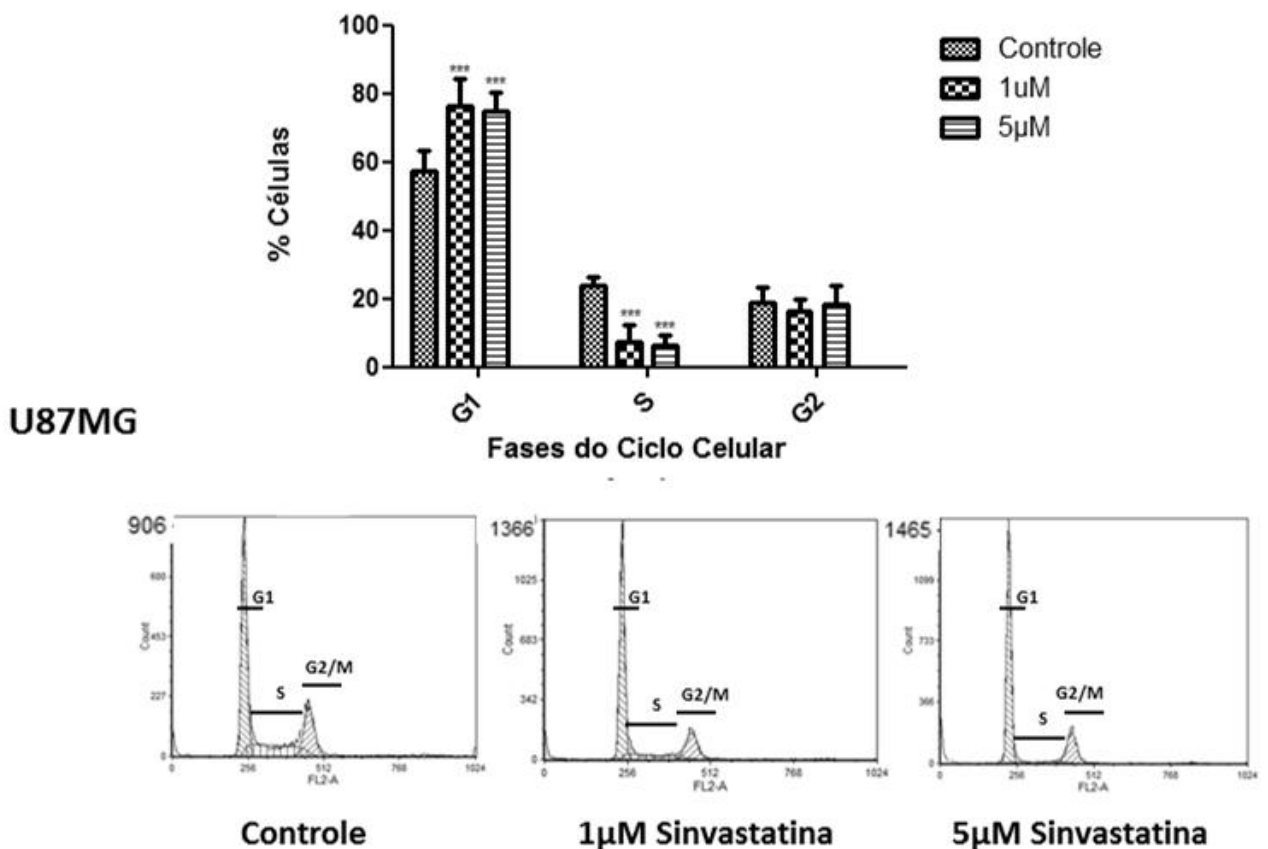


FIGURA 12: DISTRIBUIÇÃO DA LINHAGEM U87MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 µm durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5µM. O resultado corresponde a quatro experimentos independentes realizados em duplicata, sendo o histograma representativo desses 4 experimentos. Os dados de significância foram obtidos sempre em relação ao controle. ANOVA com Tukey * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Em relação aos resultados obtidos com as células U87MG, verificou-se que

o tratamento com sinvastatina na dose de 1 μ M já promove alterações significativas na progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular, e isso se repete para a maior dose (figura 12). Observa-se um aumento significativo em torno de 20% da porcentagem de células para as duas doses na fase G1 do ciclo celular, com concomitante diminuição na fase S sem causar diferença significativa na fase G2/M. Esse aumento a porcentagem de células na fase G1 e diminuição na fase S fica bastante evidente ao olharmos o histograma representativo.

Na linhagem de glioma humano T98G, não houve diferença significativa na progressão do ciclo celular comparando o tratamento nas doses de 1 e 5 μ M com o controle (figura 13, abaixo).

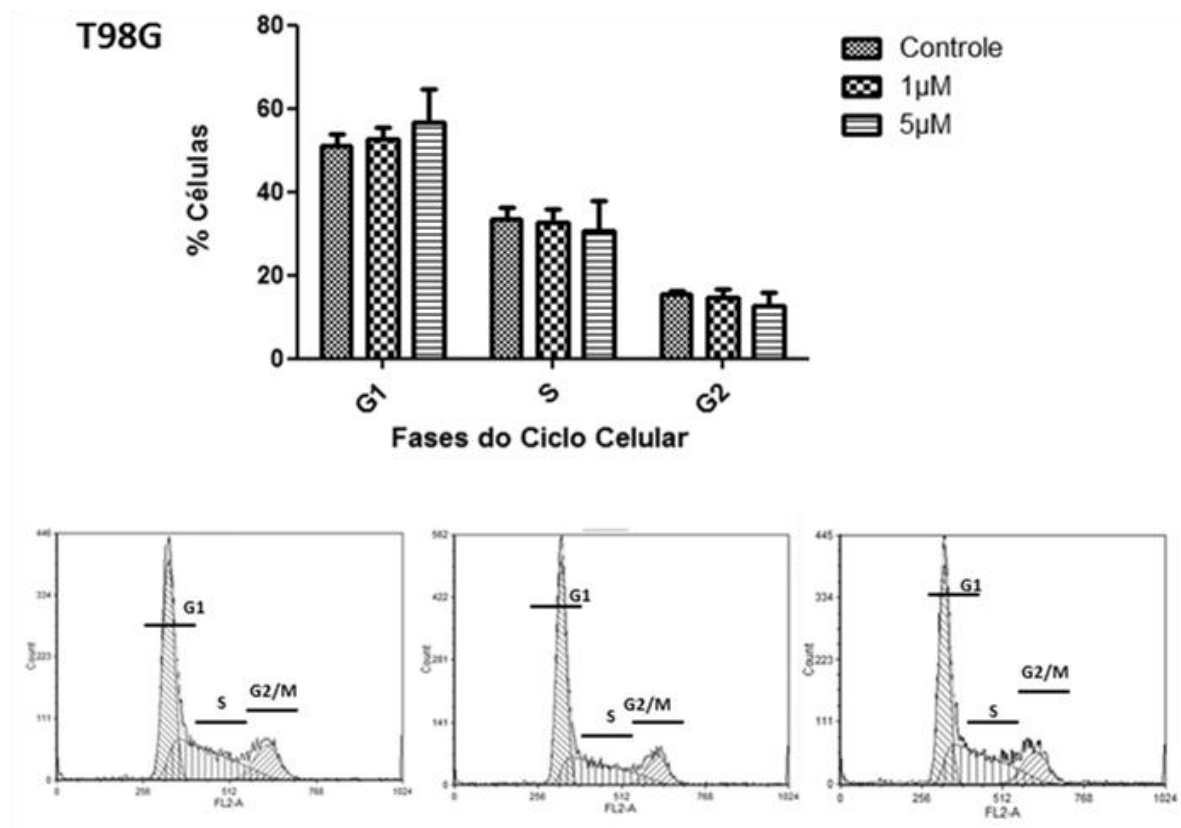


FIGURA 13: DISTRIBUIÇÃO DA LINHAGEM T98G NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 μ m durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5 μ M. O resultado corresponde a quatro experimentos independentes realizados em duplicata, sendo o histograma representativo desses 4 experimentos. Os dados de significância foram obtidos sempre em relação ao controle. ANOVA com Tukey * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

O conteúdo de DNA fragmentado foi também avaliado utilizando um

software distinto (WinMDI 2.9). Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 14 a seguir.

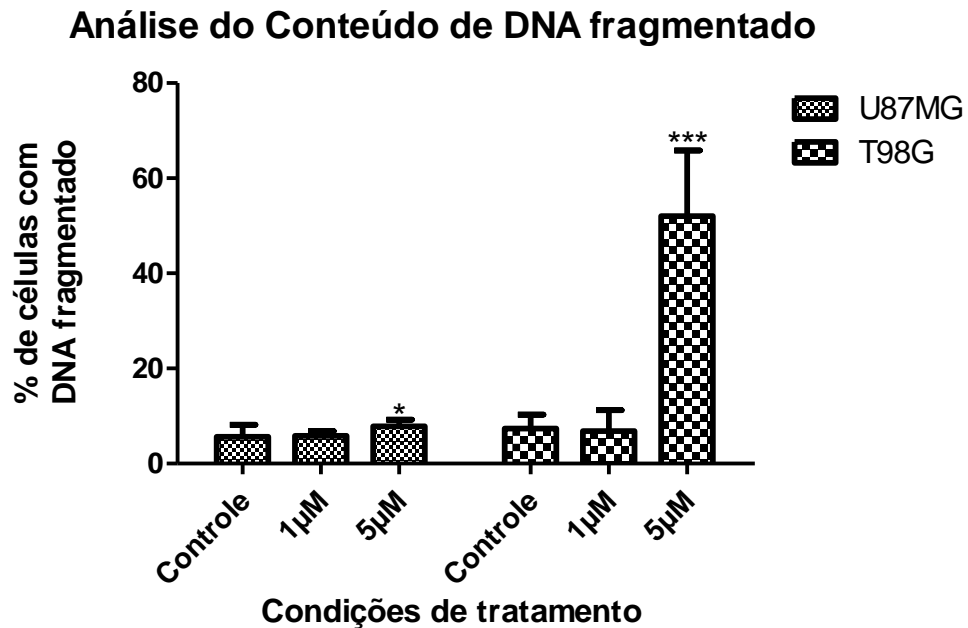


FIGURA 14: CONTEÚDO DE DNA FRAGMENTADO NAS CÉLULAS T98G E U87MG APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 µM durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5µM. O resultado corresponde a quatro experimentos independentes realizados em duplicata. O Conteúdo de DNA fragmentado foi medido utilizando o programa WinMDI 2.9. Os dados de significância foram obtidos sempre em relação ao controle. ANOVA com Tukey * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Ao analisarmos o conteúdo de DNA fragmentado (figura 14), fica claro que o tratamento com a sinvastatina foi capaz de aumentar de maneira significativa a porcentagem de células com DNA fragmentado na dose de 5µM, nas duas linhagens utilizadas, sendo que este efeito na linhagem T98G foi bastante pronunciado. Na linhagem U87MG, o conteúdo de DNA fragmentado passou de 5% na condição controle para aproximadamente 8% após o tratamento das células com sinvastatina na dose de 5µM. Já a linhagem T98G apresentava apenas 7% de células com DNA fragmentado na condição controle, e após o tratamento das células com sinvastatina na dose de 5 µM esse índice passou para 50%.

Nossos dados sugerem que as células T98G responderam ao estresse causado pela droga entrando em processo de morte, indicado pelo grande aumento do conteúdo de DNA fragmentado na dose de 5µM (Figura 14), não tendo efeito na progressão do ciclo (Figura 13). Em relação aos resultados obtidos com as células

U87MG, o tratamento com sinvastatina na dose de 1 μ M já promove alterações significativas na progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular sem aumentar o conteúdo de DNA fragmentado nessa mesma dose, indicando um perfil diferente de resposta à droga. Apesar do tratamento das células U87MG com a maior dose de sinvastatina promover um aumento do conteúdo de DNA fragmentado, o mesmo não é tão pronunciado quanto na linhagem T98G, indicando que na linhagem U87MG a sinvastatina tem um efeito maior em promover alteração na progressão do ciclo celular.

5.4 Ensaio de *scratch* in vitro

Uma das características mais importantes das células tumorigênicas é a alta capacidade de migração. Essa propriedade pode ser avaliada *in vitro* através do ensaio de *scratch*. Esse ensaio baseia-se no plaqueamento das células em alta densidade. Após isso, é feito um risco que forma uma lacuna entre as duas populações, e as células que migrarão para esse espaço irão diminuir a distância entre as lacunas. A quantificação foi feita utilizando o software do microscópio. Foram tiradas fotos logo depois das lacunas serem feitas, chamada de tempo 0h. O experimento foi acompanhado durante 48 horas, sendo tiradas fotos pontuais em 24 e 48 horas. Os resultados obtidos encontram-se nas figuras 15 e 16, a seguir.

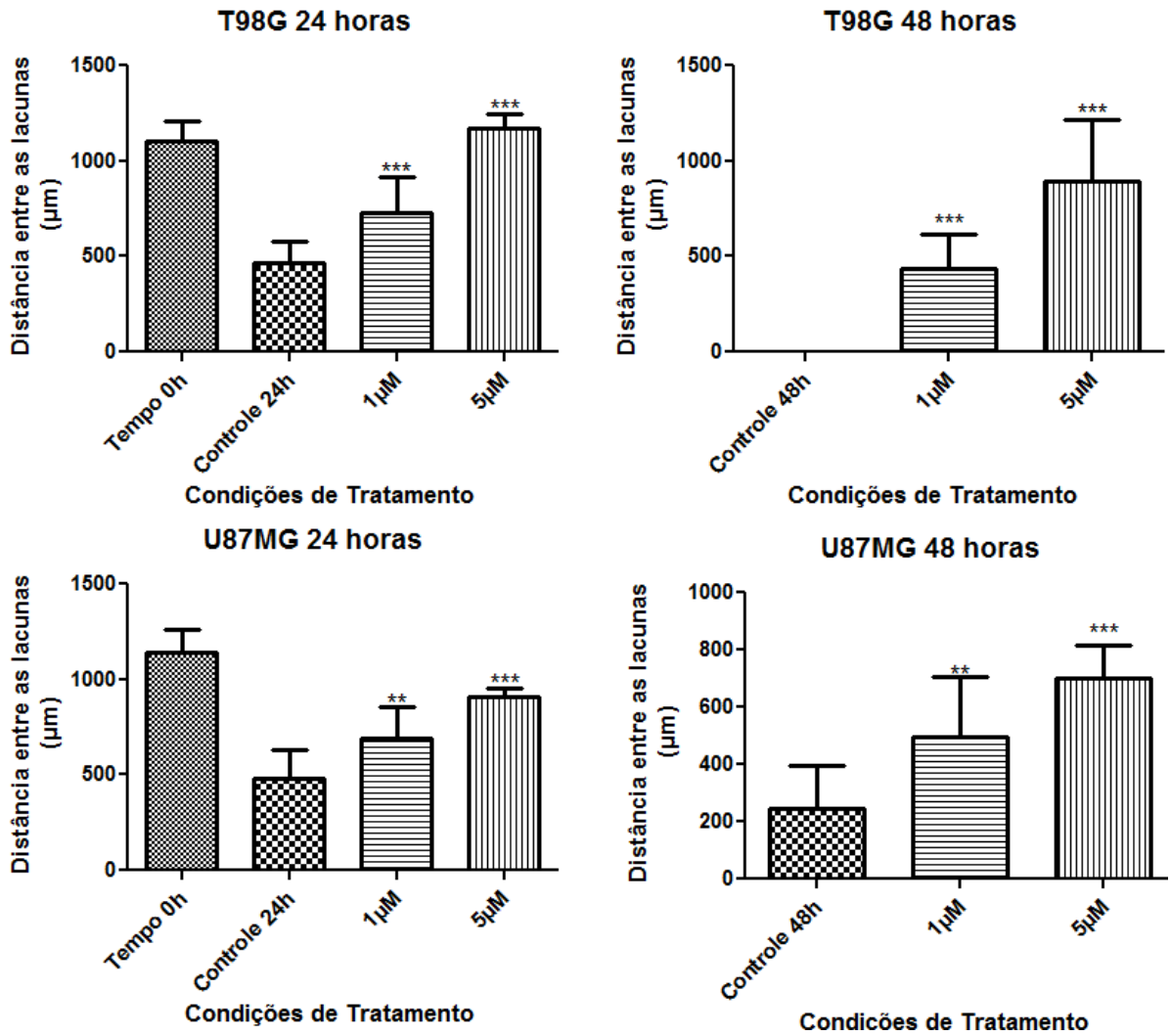


FIGURA 15: INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO NAS CÉLULAS T98G E U87MG APÓS O TRATAMENTO APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 µm durante 24 e 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5µM. Experimento realizado três vezes independentemente, em triplicata. Os valores em µm são referentes à média de 3 campos medidos para cada condição. Os dados de significância foram obtidos sempre em relação ao controle. ANOVA com Tukey, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

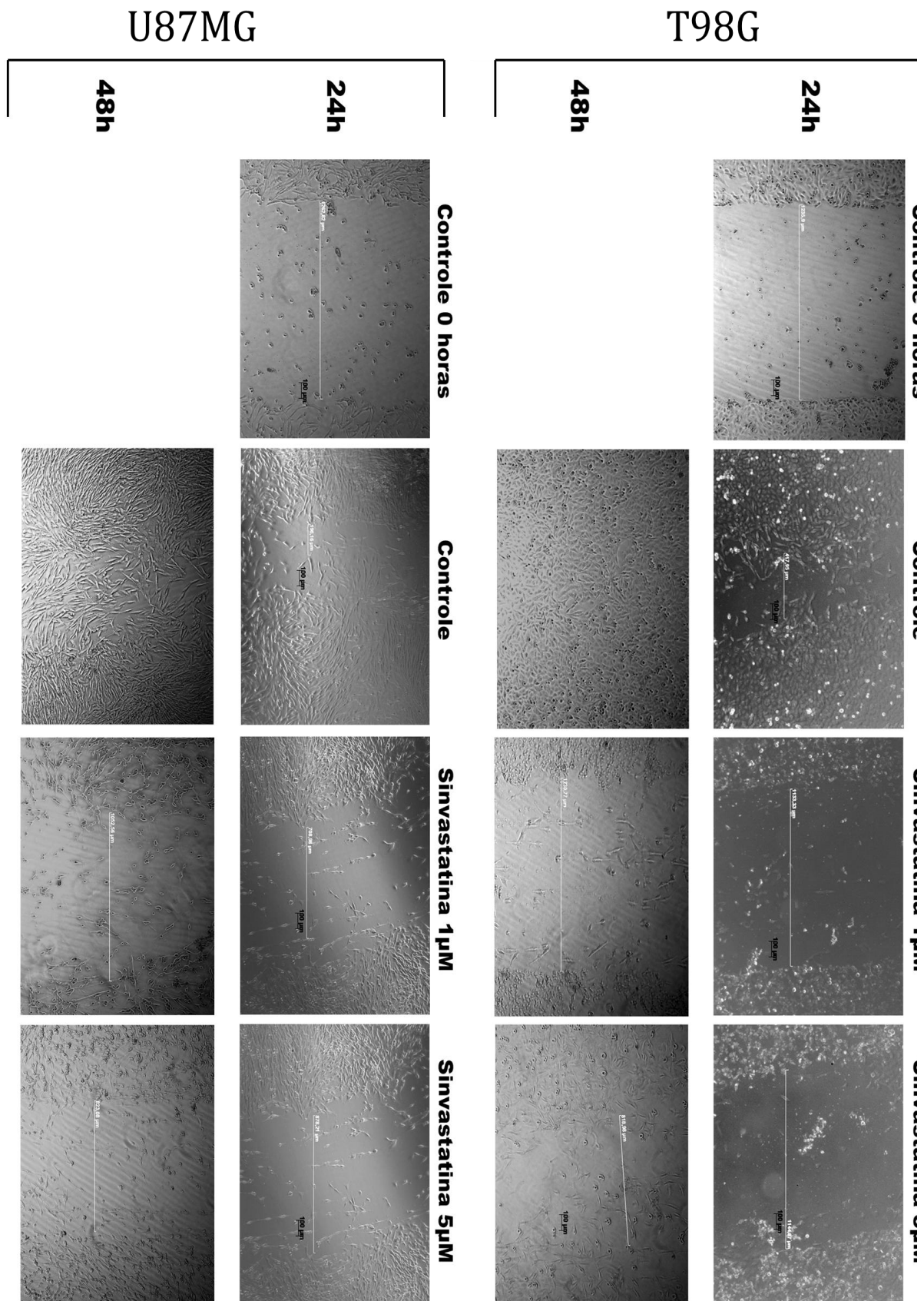


FIGURA 16 :MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DO ENSAIO DE SCRATCH. As micrografias representam os três experimentos, aumento de 400x.

Os resultados desse experimento mostram que tanto para a linhagem T98G quanto para a U87MG, a sinvastatina foi capaz de diminuir a migração celular já na menor dose (1 μ M) e no tempo de 24 horas, e esse perfil se estende para a dose de 5 μ M, onde o espaço entre as lacunas ainda é maior do que em 1 μ M (figuras 15 e 16). Nesse tempo, nota-se que as células foram capazes de migrar na condição controle, diminuindo o espaço criado pelo risco em aproximadamente 50% em relação ao tempo 0h para as duas linhagens. O tratamento de 5 μ M nas duas linhagens, principalmente a T98G, inibiu quase que completamente a migração dessas células, visto que a lacuna tem em média o mesmo tamanho do tempo 0h. Vale ressaltar que nesse tempo de tratamento não há alterações significativas na morfologia e viabilidade celular, evidenciando o efeito da sinvastatina na inibição da migração.

Após 48 horas de tratamento, a inibição da migração torna-se ainda mais pronunciada (figuras 15 e 16). Na linhagem T98G, as células da condição controle já conseguiram fechar completamente a lacuna (Figuras 15 e 16) enquanto as células com o tratamento de 1 e 5 μ M ainda possuem um grande espaço (aproximadamente 432 μ m para 1 μ M e 890 μ m para 5 μ M) entre os dois lados do poço da placa de cultura (figuras 15 e 16). Já a linhagem U87MG ainda possui um pequeno espaço na condição controle em 48 horas (em torno de 245 μ m), indicando que a linhagem T98G possui uma maior capacidade de migração. Mas quando comparamos o controle da U87MG com os tratamentos, tanto 1 quanto 5 μ M, esse espaço é ainda mais amplo (em média 494 μ m para 1 μ M e 703 μ m para 5 μ M) demonstrando a capacidade de inibição da migração da sinvastatina.

5.5 Análise dos níveis de mRNA das MMPs e seus inibidores

As células de glioblastoma humano T98G e U87MG foram cultivadas e tratadas com sinvastatina nas 2 diferentes doses por 48 horas para a realização dos ensaios de expressão gênica. Como controle, foram novamente utilizadas células tratadas somente com o veículo da droga, etanol. Após a extração do RNA, foi realizada a síntese do cDNA, que foi submetido à reação de PCR em tempo real, onde foram utilizados primers específicos para o gene *RECK* humano, bem como para seu transcrito alternativo RECK-B, MMP2, 9 e MT1-MMP, assim como para as

TIMPs 1, 2, 3 e 4. Os dados relativos à expressão dos genes de interesse foram normalizados em relação à três genes de expressão constitutiva: hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT), relacionado ao metabolismo de purinas; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gene constitutivamente ativo da via glicolítica, e o hidroximetilbilano sintase (HMBS) que codifica para uma enzima de mesmo nome ativa na produção da molécula heme. Esses genes não tiveram sua expressão significativamente alterada com o tratamento.

Os resultados foram obtidos para cada gene individual analisado em relação ao seu respectivo controle, linearizados pela eficiência de cada *primer* específico, e normalizado pela expressão dos três diferentes genes endógenos (VANDESOMPELE, J. *et al.*, 2001) .

A figura 17 representa os resultados referentes à expressão das metaloproteinases de matriz, que mostraram-se bastante distintos entre as linhagens.

Expressão mRNA

Metaloproteinases de matriz

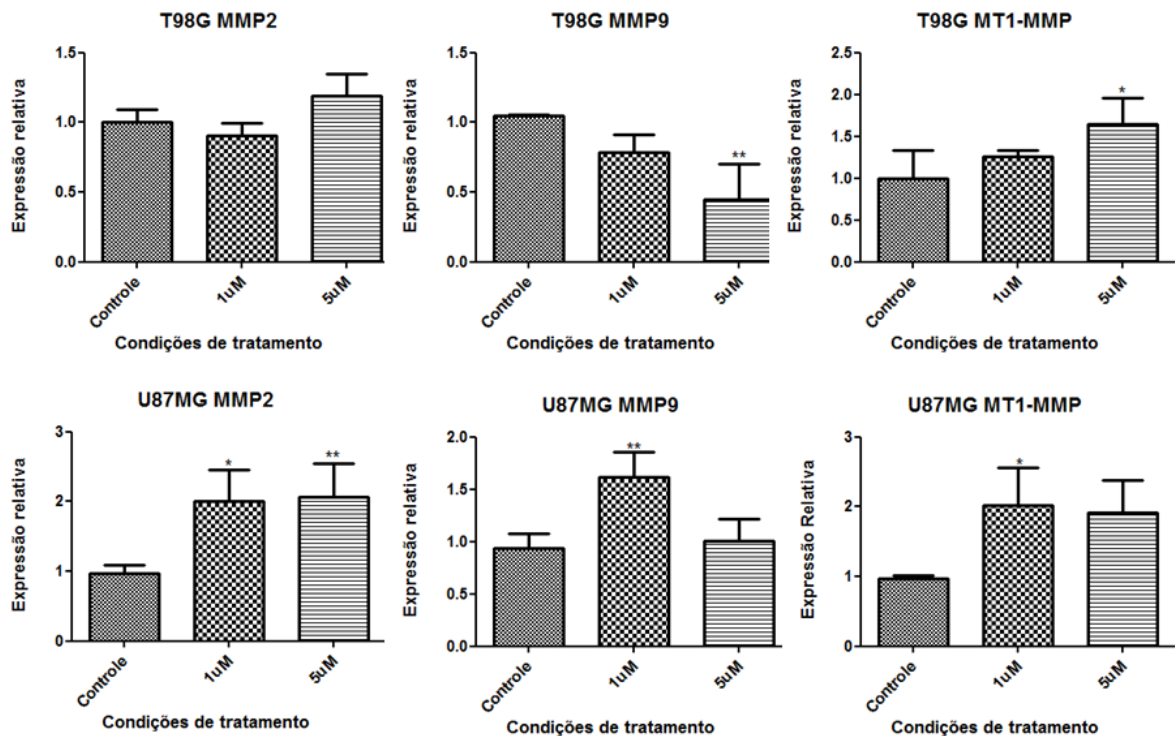


FIGURA 17: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2, 9 E MT1-MMP APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 µm durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5µM. O resultado representa 5 experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (hGAPDH, hHPRT e hHMBS). ANOVA com Tukey, * = p<0,05 ; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Quanto à linhagem T98G, o tratamento com sinvastatina foi capaz de diminuir a expressão da MMP9, não modulou a expressão da MMP2 e aumentou a expressão da MT1-MMP na dose de 5 μ M, não tendo efeito na expressão de nenhum desses genes em relação ao controle na dose de 1 μ M. Na linhagem U87MG, o tratamento utilizando as duas doses de sinvastatina foi responsável por um aumento na expressão da MMP2, causando aumento apenas em 1 μ M na expressão da MMP9 e MT1-MMP. Devido a esses resultados, fomos investigar se esse aumento verificado a nível de expressão também se refletia no aumento da atividade das MMPs, utilizando zimografia (ensaio demonstrado pela figura 24).

A seguir, avaliamos os níveis de mRNA dos inibidores solúveis clássicos das MMPs, as TIMPs, utilizando *primers* específicos para as 4 TIMPs encontradas em humanos. Os resultados encontram-se na figura 18, abaixo:

Expressão mRNA

TIMPs

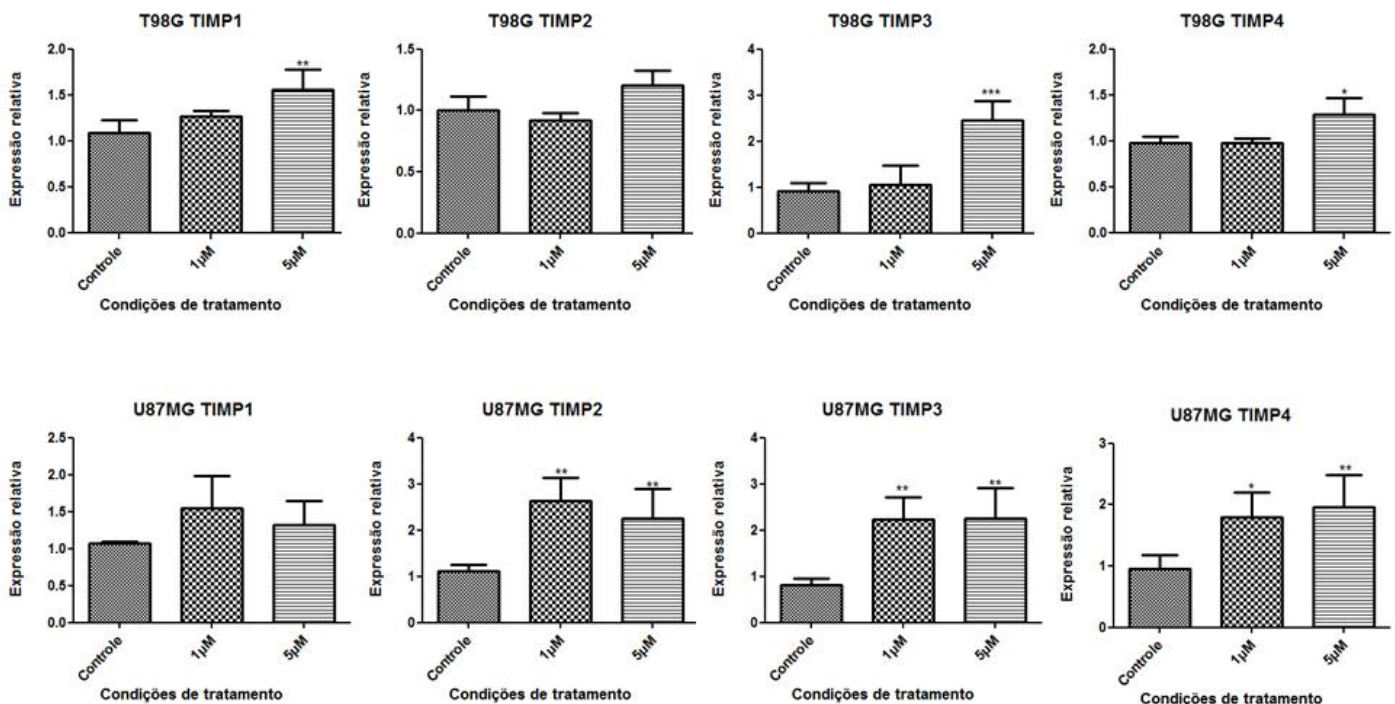


FIGURA 18: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS INIBIDORES SOLÚVEIS CLÁSSICOS DAS MMPs (TIMPs) APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 μ M durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5 μ M. O resultado representa 5 experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (hGAPDH, hHPRT e hHMBS). ANOVA com Tukey, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Observamos após as análises por qPCR que, para a linhagem T98G, o

tratamento com 5 μ M de sinvastatina aumentou significativamente os níveis de mRNA de TIMP1, 3 e 4, com uma tendência clara de aumento para a TIMP2 nessa dose. Destaca-se entre todos, o aumento de TIMP3, quase três vezes maior em relação ao controle. A menor dose não teve efeito na expressão das TIMPs nessa linhagem. Para as células U87MG, já na menor dose de sinvastatina (1 μ M) observou-se um aumento nos níveis de expressão das TIMPs 2, 3 e 4, e esse aumento também se confirmou na maior dose (5 μ M). Vale ressaltar que essa linhagem teve um aumento de expressão bastante pronunciado para os inibidores mencionados. A expressão da TIMP1 mostrou uma tendência bastante clara de aumento nessa linhagem também nas duas doses, porém esses dados não foram estatisticamente significativos.

Os dados de análise de expressão das TIMPs revelaram-se muito interessantes, pois, diferentemente do encontrado na expressão das MMPs, o tratamento com a sinvastatina foi capaz de aumentar de forma homogênea a expressão de todas as TIMPs nas duas linhagens estudadas. Dessa maneira, fomos avaliar as razões entre os níveis de mRNA das TIMPs e MMPs. Os resultados obtidos encontram-se na figura 19, a seguir.

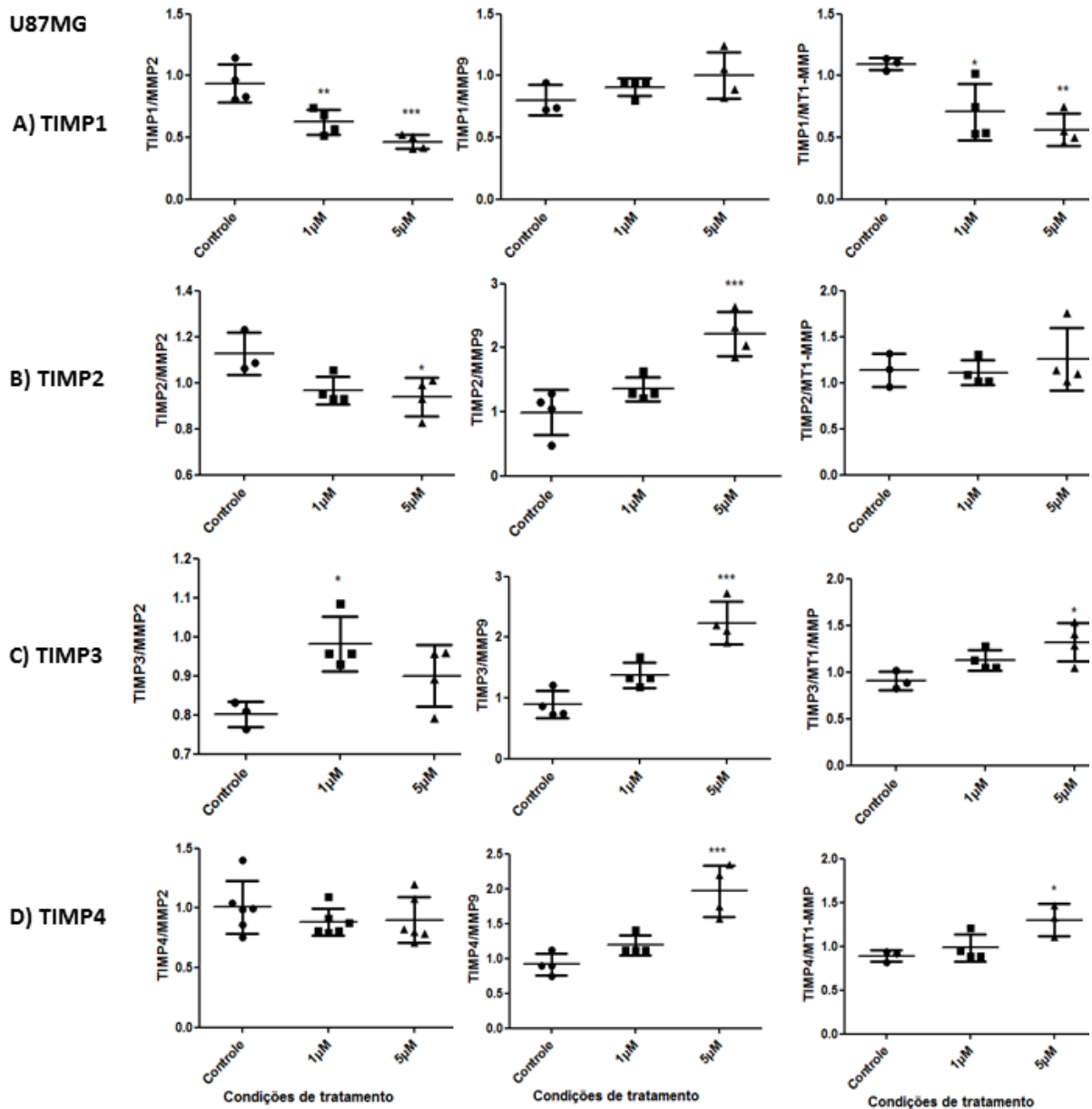


FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPs DA LINHAGEM U87MG. Fileiras: (A) TIMP1; (B) TIMP2; (C) TIMP3 e (D) TIMP 4. Resultados representam a média das razões de seis experimentos independentes. ANOVA com TUKEY, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Os resultados obtidos sobre as razões de mRNA de TIMPs/MMPs corroborou com os dados de expressão, e ainda demonstrou que o tratamento com sinvastatina em muitos casos está alterando expressão gênica a favor dos inibidores.

Referente à linhagem U87MG, os dados mostram que provavelmente a TIMP1 não esteja contribuindo de forma expressiva para a inibição das metaloproteinases de matriz analisadas no estudo, visto que a razão TIMP1/MMP2 e

TIMP1/MT1-MMP diminuem com o tratamento de sinvastatina nas doses de 1 e 5 μ M, e a razão TIMP1/MMP9 não é alterada (Figura 19, parte A). Já a TIMP2 tem uma menor expressão em relação a MMP2 após o tratamento com sinvastatina na dose de 5 μ M, porém, têm-se maiores níveis de TIMP2 em relação à MMP9. Ainda sobre a MMP9, seus níveis estão diminuídos em relação não só a TIMP2, mas também em relação às TIMPs 3 e 4 na dose de 5 μ M de sinvastatina, um dado bastante importante, enfatizando que a TIMP3 inibe muito fortemente a MMP9 (revisado por Hagemann, 2012), demonstrando que a atividade dessa MMP tão importante no processo invasivo de glioblastomas (CHINTALA *et al.*, 1999; Hagemann *et al.*, 2012) pode estar sendo inibida pelas TIMPs após o tratamento com sinvastatina. É importante ressaltar que a TIMP3 parece possuir um papel bastante importante na inibição de MMPs mediada por sinvastatina na linhagem U87MG, já que a TIMP3 tem seus níveis elevados em relação aos 3 tipos de MMPs estudadas (MMP2, MMP9 e MT1-MMP), sendo esse aumento estatisticamente significativo para a dose de 1 μ M em relação a MMP2, e para 5 μ M em relação à MMP9 e MT1-MMP. Já a TIMP4 tem uma maior expressão de mRNA em relação a MMP9 e à MT1-MMP nas doses de 5 μ M.

As razões de mRNA dos inibidores/MMPs também foram realizadas para a linhagem T98G, e os resultados obtidos encontra-se na figura 20.

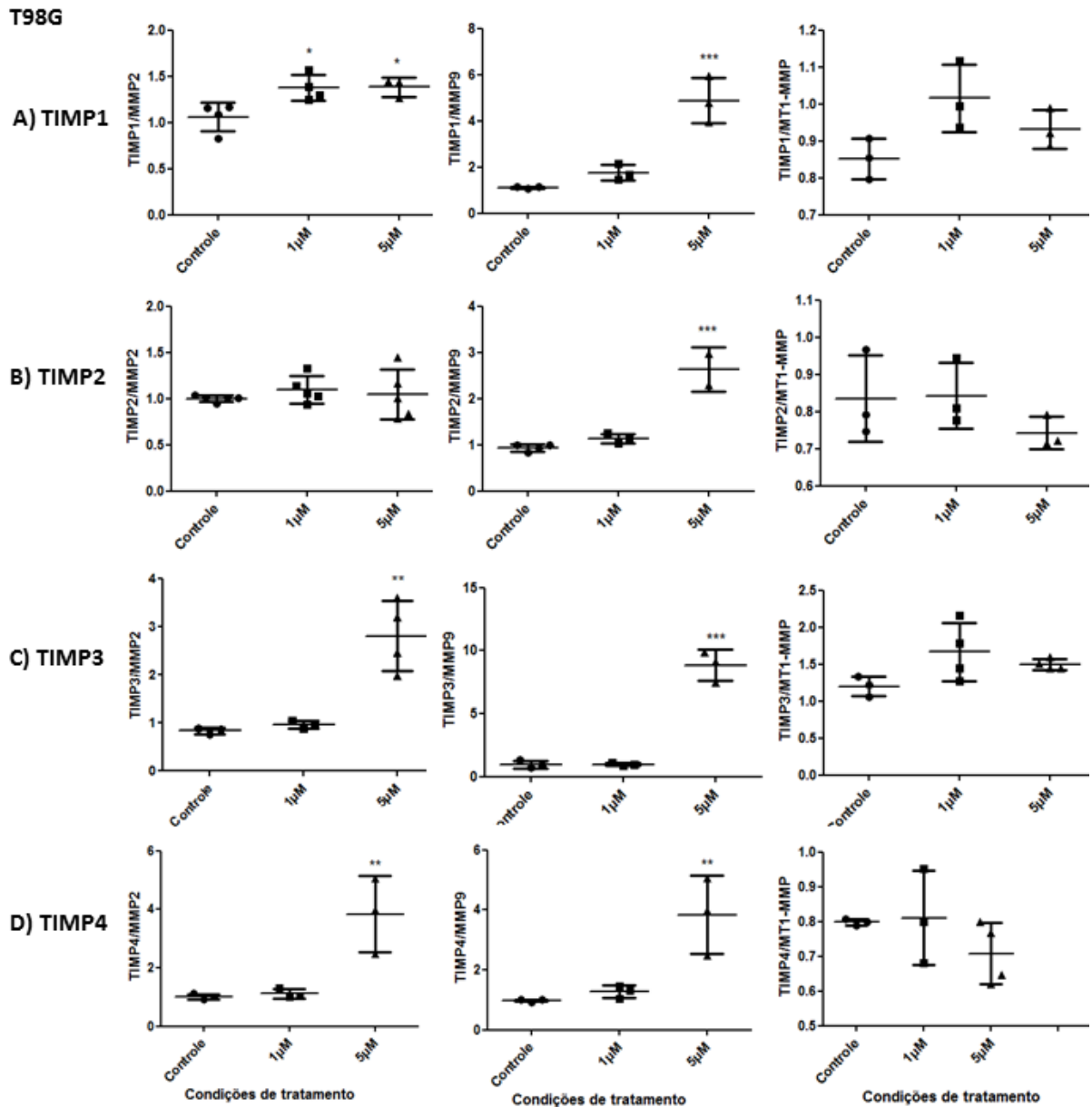


FIGURA 20: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPs DA LINHAGEM T98G. Fileiras: (A) TIMP1; (B) TIMP2; (C) TIMP3e (D) TIMP 4. Resultados representam a média das razões de cinco experimentos independentes. ANOVA com TUKEY, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

A análise das razões TIMPs/MMPs para a linhagem T98G mostrou que a TIMP1 tem um perfil de expressão em relação à MMPs bastante distinto daquele observado para a linhagem U87MG (figura 19, parte A e B). Observa-se um aumento dos níveis de mRNA de TIMP1 em relação à MMP2 nas doses de 1 e 5µM, e em relação à MMP9 na dose de 5µM (figura 20, parte A). Ainda sobre a MMP9, as razões mantiveram um mesmo perfil do que a linhagem U87MG, só que foi visto que para linhagem T98G, todas as TIMPs tiveram um aumento em relação à MMP9 na dose de 5µM de sinvastatina. É importante enfatizar ainda o aumento das TIMPs 3 e 4, em relação as MMP2 e 9, ocorridos na dose de 5µM, e que essas duas TIMPs

tiveram um aumento quase que homogêneo nas duas linhagens estudadas (Figura 19 e 20, partes C e D).

Um resumo da ação da sinvastatina sobre a razão de expressão de mRNA encontra-se na tabela 5, abaixo:

TABELA5: RESUMO DA AÇÃO DA SINVASTATINA SOBRE AS RAZÕES DE EXPRESSÃO NO NÍVEL DE MRNA DE TIMPS E MMPS NAS LINHAGENS U87MG E T98G.

RAZÕES	U87MG	T98G
TIMP1/MMP2	Diminui em 1 e 5 μ M	Aumenta em 1 e 5 μ M
TIMP1/MMP9	Não altera	Aumenta em 5 μ M
TIMP1/MT1-MMP	Diminui em 1 e 5 μ M	Não altera
TIMP2/MMP2	Diminui em 5 μ M	Não altera
TIMP2/MMP9	Aumenta em 5 μ M	Aumenta em 5 μ M
TIMP2/MT1-MMP	Não altera	Não altera
TIMP3/MMP2	Aumenta em 1 μ M	Aumenta em 5 μ M
TIMP3/MMP9	Aumenta em 5 μ M	Aumenta em 5 μ M
TIMP3/MT1-MMP	Aumenta em 5 μ M	Não altera
TIMP4/MMP2	Não altera	Aumenta em 5 μ M
TIMP4/MMP9	Aumenta em 5 μ M	Aumenta em 5 μ M
TIMP4/MT1-MMP	Aumenta em 5 μ M	Não altera

FONTE: (O autor, 2013).

Analisados os dados dos inibidores solúveis das MMPs, e suas razões de expressão em relação às metaloproteinases de matriz, fomos avaliar se o tratamento com a sinvastatina foi capaz de modular a expressão do inibidor de MMPs ancorado a membrana, RECK, e seu transcrito alternativo RECKB. O resultado obtido encontra-se na figura 21.

Expressão mRNA

RECK A e RECKB

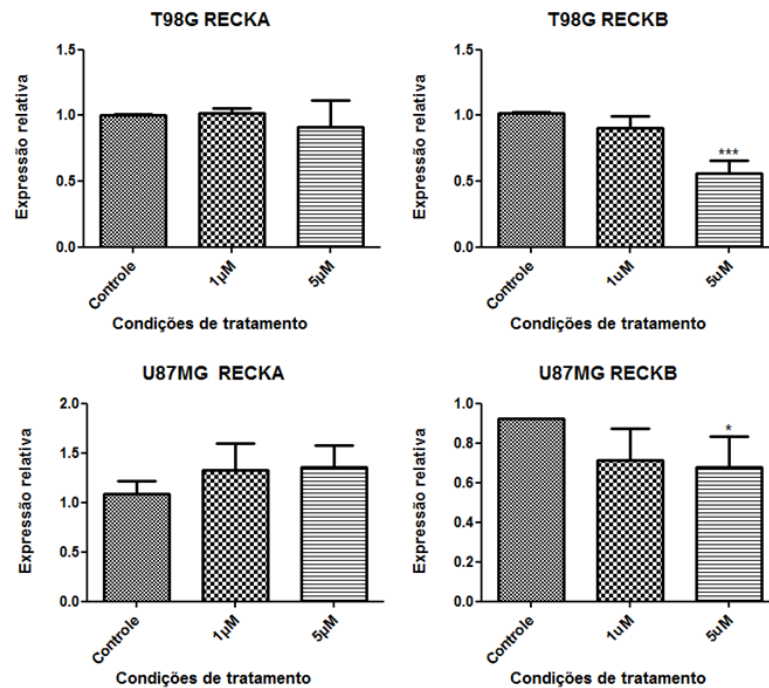


FIGURA 21: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECK CANÔNICO (RECKA) E SUA ISOFORMA ALTERNATIVA RECKB APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 µM durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5µM. O resultado representa 5 experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos genes de interesse frente à expressão dos genes de controle interno (hGAPDH, hHPRT e hHMBS). ANOVA com Tukey, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Em relação ao RECK canônico, existe uma tendência ao aumento nos níveis desse transcrito na linhagem U87MG, porém estes dados não são estatisticamente significativos. Não houve modulação no transcrito canônico RECKA na linhagem T98G após o tratamento com sinvastatina.

Os dados obtidos sobre os níveis do transcrito alternativo B de *RECK*, mostram uma diminuição significativa deste transcrito nas duas linhagens na dose de 5µM.

A partir desses dados, foram avaliadas as razões de mRNA de RECK das isoformas A e B, nas duas linhagens estudadas. O resultado encontra-se na figura 22, a seguir.

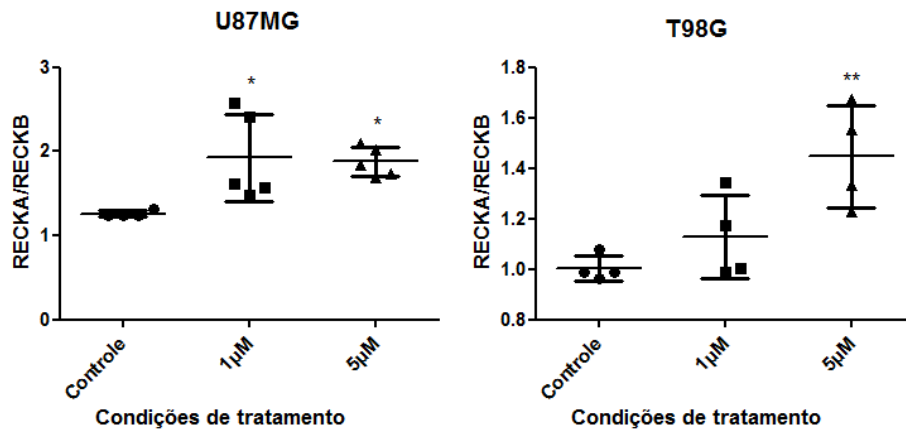


FIGURA 22: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES RECKA/RECKB DAS LINHAGENS T98G E U87MG APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 μM durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5 μM . Resultados representam a média das razões de cinco experimentos independentes. ANOVA com TUKEY, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Os dados das razões das isoformas de RECK mostraram que o tratamento com a sinvastatina altera a razão a favor de RECKA na linhagem U87MG nas doses de 1 e 5 μM (Figura 22) e na dose de 5 μM na linhagem T98G. De maneira interessante, pode-se sugerir que o tratamento com a sinvastatina nessa dose foi capaz de alterar de alguma maneira o *splicing* alternativo de RECK a favor da isoforma canônica que tem um efeito antitumoral em detrimento da isoforma B que é a isoforma possivelmente relacionada a um fenótipo maligno.

5.6 Avaliação dos níveis protéicos de RECK

Após a análise de expressão, foi verificado que os níveis de RNA mensageiro de RECKA não foram alterados com o tratamento (Figura 21). Posto isso, foi avaliado como se encontravam os níveis protéicos de RECK, através da metodologia de Western-blotting. Com esta finalidade, as duas linhagens de glioma foram tratadas com sinvastatina (1 e 5 μM) por 48 horas e seguiu-se o protocolo para extração protéica e SDS-Page conforme descrito no item 4.7 de Materiais e Métodos. Os resultados obtidos estão representados a seguir.

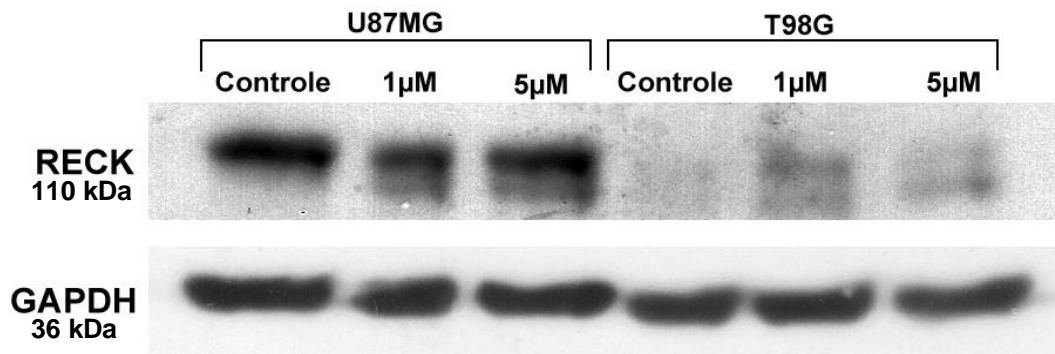


FIGURA 23: DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECK CANÔNICA (RECKA) NOS EXTRATOS DE PROTEÍNA TOTAL DA LINHAGEM U87MG E T98G APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 μM durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5 μM . A figura mostra a membrana de PVDF hibridizada com anticorpos anti-RECK e anti-GAPDH. Resultado representativo de três experimentos realizados.

A figura 23 representa o resultado de três experimentos independentes, onde todos tiveram o mesmo perfil. Pode-se verificar que há um leve aumento dos níveis protéicos de RECK canônico após o tratamento com sinvastatina ao considerarmos a banda superior e banda inferior logo abaixo, nas duas linhagens utilizadas. A linhagem U87MG demonstrou ter níveis protéicos de RECK maiores do que a linhagem T98G, tanto no tratado, quanto no controle. Considerando a linhagem T98G, observamos a banda referente ao controle aparece de maneira muito fraca, mas com o tratamento principalmente na dose de 1 μM a banda aparece de maneira mais intensa. Notamos que o tratamento com a sinvastatina gerou o aparecimento de uma segunda banda, e esse perfil repete-se nos ensaios independentes. Esse comportamento já foi visto em outros trabalhos que também realizaram Western Blotting para a proteína RECK, como por exemplo Hatta e colaboradores em 2009, mas nenhum desses trabalhos cita o porquê da formação dessa segunda banda. Acreditamos que trata-se mesmo da proteína RECK, já que não houve nenhum background indicando ligações inespecíficas e o bloqueio da membrana de PVDF foi eficiente, mas que foi modificado de alguma maneira em que ficasse um pouco mais leve, ou por alguma clivagem, ou por alguma modificação pós-traducional resistente ao SDS-PAGE.

5.7 Zimografia

Em decorrência dos resultados obtidos pelo qPCR onde foi visto que o tratamento com a sinvastatina promoveu efeitos opostos na modulação da expressão das MMPs, foi verificado também se o tratamento estava alterando a atividade proteolítica dessas enzimas. Para isso, utilizamos o ensaio de zimografia, que resumidamente baseia-se na coleta do sobrenadante dessas células tratadas, que foi aplicado em um gel de poliacrilamida contendo também gelatina, o substrato para a MMP2 e 9, as quais gostaríamos de verificar a atividade. Após a eletroforese, as enzimas são renaturadas, e o gel é incubado com um tampão, e após 18 horas de incubação, esse gel é corado. A figura 24 abaixo mostra os resultados obtidos.

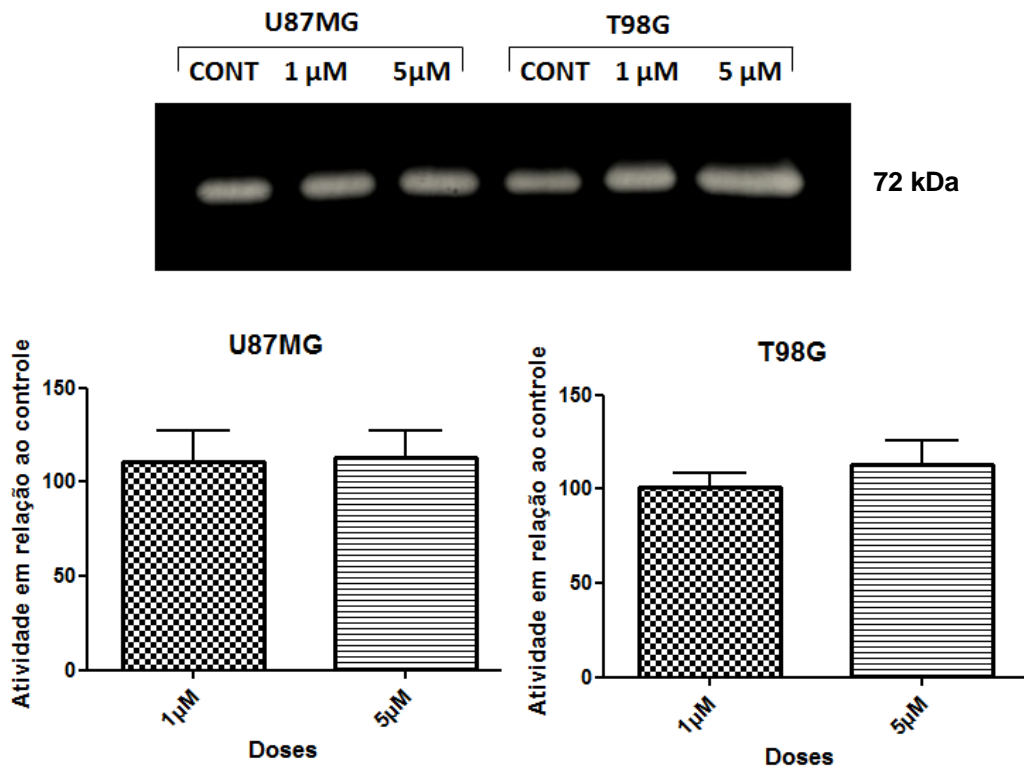


Figura 24: ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA MMP2 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA. As doses utilizadas foram 1 e 5 μM durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de 5 μM. Figura representativa de 6 experimentos independentes. Quantificação das bandas obtidas em 6 experimentos independentes, utilizando o software ImageJ. Valores de atividade obtidos em relação ao controle. ANOVA com Tukey, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Podemos perceber que apesar do tratamento das células U87MG com

sinvastatina aumentar os níveis de mRNA da MMP2 (Figura 17), a atividade proteolítica desta enzima não é alterada com o tratamento (Figura 24). (Já na linhagem T98G, o tratamento com sinvastatina não modulou também o mRNA - Figura 17), nem a atividade da enzima (Figura 24).

Com esse experimento, esperaria-se visualizar também a atividade da MMP9. Porém, em nenhum dos experimentos, foram obtidas bandas de atividade proteolítica referente a essa enzima, mesmo aumentando o tempo de incubação do gel. Ao buscarmos na literatura, encontramos uma compilação das MMPs em várias linhagens de glioma humano realizado por Hagemann em 2012 que mostra que a presença da MMP9 nas duas linhagens utilizadas em nosso trabalho permanece controversa, pois é descrita somente em alguns dos trabalhos citados.

5.8 Isolamento de membranas resistentes a detergentes

Visto que a proteína RECK encontra-se principalmente localizada nos *lipid rafts*, e que a sinvastatina ao inibir a síntese de colesterol causa a disrupção desses micro domínios, realizamos o isolamento das membranas resistentes a detergentes para a avaliação da possível alteração na localização da proteína RECK após o tratamento. Utilizamos como controle a flotilina, uma proteína que está localizada preferencialmente nos *lipid rafts*. Após o isolamento e o fracionamento por centrifugação utilizando um gradiente de sacarose, foram retiradas alíquotas, onde cada uma deu origem a uma fração. Foram retiradas 13 frações, mas utilizamos somente as 10 primeiras para realizar o Western Blotting. Foi aplicada a mesma quantidade em volume dessas frações nos poços do gel de eletroforese. Esse experimento foi realizado apenas com a linhagem U87MG visto que essa expressa muito mais a proteína RECK do que a linhagem T98G, como já foi mostrado nos experimentos de Western Blotting anterior (Figura 23). Optamos por não realizar o ensaio com as duas doses de sinvastatina estudadas até o momento (1 e 5 μ M) pela quantidade de material e células requeridas para esse método, já que para somente as duas condições já utilizamos 9 garrafas grandes de cultura. Sendo assim, foi avaliado apenas o tratamento das células U87MG com sinvastatina na dose de 1 μ M, O resultado obtido encontra-se a seguir:

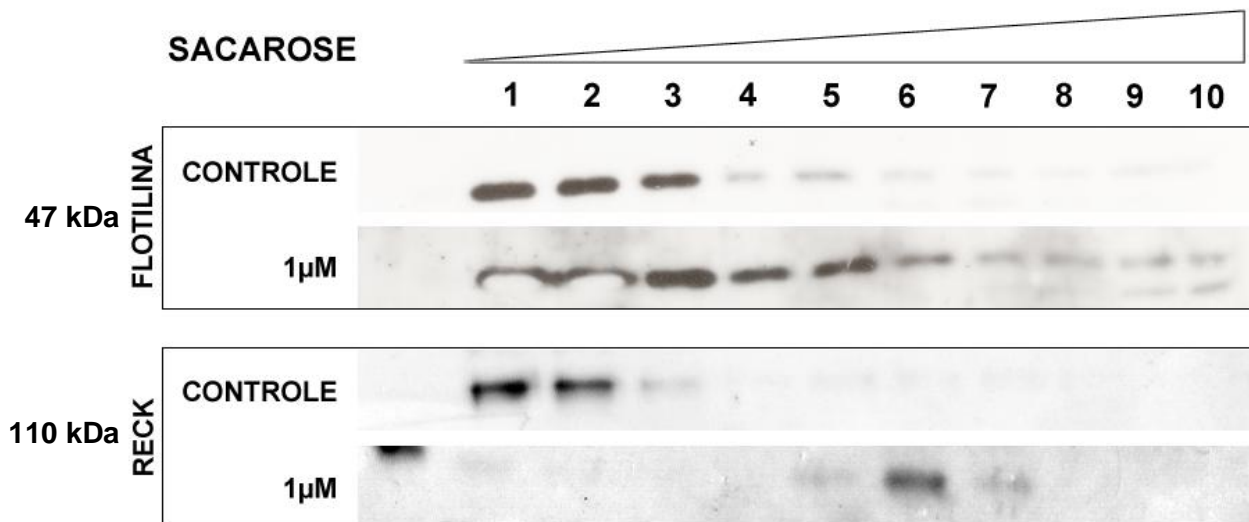


FIGURA 25: DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS RECK E FLOTILINA NAS FRAÇÕES OBTIDAS PELO ISOLAMENTO DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTES. A dose utilizada foi $1\mu\text{M}$ durante 48 horas, na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga, etanol, na mesma concentração referente à dose de $1\mu\text{M}$. Os dados representados são referentes a um experimento realizado.

Inicialmente para a flotilina, nota-se que no controle, a proteína está localizada principalmente nas primeiras três frações geradas pelo gradiente de sacarose, o que é normalmente encontrado para as frações referentes aos *lipid rafts* isolados por esse protocolo. Após o tratamento com $1\mu\text{M}$ de sinvastatina, fica bastante claro que essa proteína característica por estar presente preferencialmente nesses micro domínios acabou aparecendo pelo menos nas 6 primeiras frações, sugerindo que a inibição da síntese do colesterol promovida pelo tratamento com a sinvastatina pode mesmo estar causando uma disrupção das balsas lipídicas, espalhando as proteínas que encontravam-se preferencialmente nessa região por outras regiões da membrana celular.

Após a incubação da membrana com o anticorpo específico para a proteína RECK, observamos que na condição controle a mesma encontra-se co-localizada com a flotilina nas regiões dos *lipid rafts*. Essa localização de RECK está de acordo com os dados descritos na literatura (OMURA *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2011).

Após o tratamento das células U87MG com $1\mu\text{M}$ de sinvastatina, a proteína RECK foi detectada sobretudo nas frações 6 e 7, que representam regiões não-*rafts*, indicando que o tratamento foi capaz de alterar completamente a localização de RECK na membrana. Esse resultado é bastante relevante, pois sugere que o tratamento com a sinvastatina pode estar afetando a ação dessa proteína como inibidor de MMPs, diminuindo sua importância para a ação anti-invasiva da sinvastatina.

6 DISCUSSÃO

Considerando a elevada taxa de mortalidade dos gliomas de alto grau devido principalmente à sua capacidade de invasão e subsequente alta taxa de recidiva, o presente trabalho teve como objetivo aumentar o conhecimento científico sobre a ação da sinvastatina em alvos terapêuticos capazes de atuar na contenção da invasão em modelo de glioma humano. Para isso, primeiramente visamos complementar e corroborar os dados da literatura sobre os efeitos da sinvastatina na citotoxicidade, alteração morfológica, parada de proliferação e migração nos modelos escolhidos nesse trabalho. A seguir, buscamos correlacionar esses dados fenotípicos com a análise de expressão, em nível de mRNA e proteína, atividade e localização na membrana das MMPs e seus inibidores.

Inicialmente, foram analisadas as mudanças morfológicas causadas pelo tratamento com a sinvastatina nas linhagens de glioblastoma humano. O tratamento das células T98G e U87MG com 1 e 5 μ M de sinvastatina foi acompanhado durante 48 horas. Nossos dados mostraram alterações morfológicas bastante características principalmente após 48 horas (Figura 10). As células tornaram-se menores, mais arredondadas e com prolongamentos mais finos. Visualmente, muitas células destacaram-se do substrato plástico, e esse resultado corrobora com os próximos ensaios realizados, que mostram o efeito citotóxico da droga (figuras 11 e 14). Essas observações estão de acordo com trabalhos prévios publicados, como o de Koyuturba e colaboradores em 2004 utilizando a sinvastatina na linhagem C6 de glioma de rato, em modelo de melanoma por Saito e colaboradores em 2008 e por Barbosa em 2010, também utilizando modelo de melanoma humano. Até o momento, os efeitos da sinvastatina sobre a morfologia/ citoesqueleto vêm sendo atribuído à alteração da atividade das proteínas Rho pelas estatinas (DENOYELLE *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2008), onde as mesmas têm importante papel no remodelamento das proteínas do citoesqueleto celular (como microtúbulos e filamentos de actina), podendo afetar tanto a morfologia quando processos de invasão e migração celular, onde esse processo é requerido (VEGA & RIDLEY, 2008). No presente estudo, observou-se que a sinvastatina foi capaz de alterar a migração das duas linhagens de glioblastoma humano (figuras 15 e 16), o que poderia também ser atribuído a deslocalização (e conseqüente perda de função)

das proteínas rho da superfície interna da membrana celular, no entanto ensaios específicos seriam necessários para confirmar essa hipótese nas linhagens utilizadas neste trabalho.

Nos experimentos de viabilidade celular, pudemos verificar que há uma redução significativa da viabilidade tanto nas células T98G quanto na U87MG, nas doses de 1 e 5 μM de sinvastatina apenas a partir de 48 horas de tratamento (figura 11). Esses dados estão de acordo com a análise morfológica, onde não se tem alterações significativas após 24 horas de tratamento (Figura 10). É interessante notar que há uma diferença na resposta das duas linhagens frente ao agente antitumoral, pois a linhagem U87MG mostrou-se mais sensível ao tratamento com sinvastatina por diminuir significativamente sua viabilidade já na dose menor (1 μM de sinvastatina), porém, de forma interessante, a porcentagem de células U87MG viáveis na dose de 5 μM de sinvastatina é um pouco maior do que a das células T98G nas mesmas condições, mostrando que as células parecem responder de maneira diferente ao tratamento com a droga. Vale ressaltar que pudemos ver um resultado bastante proeminente em doses possíveis de serem alcançadas na clínica (1 à 5 μM), segundo KNOX e colaboradores (2001), a partir de 48 horas de tratamento. O efeito citotóxico da sinvastatina foi ainda maior em 72 horas de tratamento, reduzindo a viabilidade das células de glioma humano em mais de 70% (Figura 11). Um estudo realizado por Misirkic e colaboradores em 2012 avalia a viabilidade celular após o tratamento com sinvastatina em doses que variam de 0,8 à 50 μM em linhagens de glioma de rato (C6 e U21) por 3 diferentes métodos, MTT, cristal violeta e liberação da enzima lactato desidrogenase, e mostrou que o mesmo perfil foi encontrado para todas as metodologias utilizadas, sendo o IC_{50} encontrado em aproximadamente 6 μM .

A partir dos resultados de viabilidade e morfologia, foi importante avaliar se a sinvastatina teria efeitos sobre a progressão do ciclo celular nessas linhagens. As análises realizadas destacam as diferentes respostas das duas linhagens utilizadas. Os dados obtidos a partir dos ensaios de citometria de fluxo corroboram com os dados anteriormente apresentados, visto que a porcentagem de DNA fragmentado nas células T98G tratadas com 5 μM de sinvastatina é bem maior do que aquele encontrado nas células U87MG nas mesmas condições (Figura 14). Isso mostra que a linhagem U87MG apesar de responder à droga já na menor dose de sinvastatina

avaliada (diminuindo a viabilidade), esta responde de forma distinta, levando a um aumento na porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular (figura 12), e não sofrendo tanta fragmentação de DNA (indicativo de morte celular). A linhagem T98G, no entanto, apesar de responder à droga somente na maior dose de sinvastatina avaliada (5 μ M), quando esta responde temos efetivamente um aumento de células com DNA fragmentado (Figura 14), sem interferir na progressão do ciclo celular (figura 13). É interessante citar que esse mesmo perfil de resposta a agentes antitumorais nas células U87MG foi visto também por Amstalden em 2011, que testou a ação do flavonóide quercetina em linhagens de glioma humano (U87MG e U373MG). Esse resultado corrobora com os dados da literatura para diversos modelos, já que as estatinas já vêm sendo reportadas por aumentar os níveis de p21 e p27 por inibir RhoA (que ocasiona uma diminuição desses inibidores de CDK)(SAITO *et al.*, 2008), e também por diminuir a degradação de ambos inibidores via proteossomo (Osmak, 2012). Porém, na linhagem T98G a sinvastatina não teve efeito na parada do ciclo celular em nenhuma das doses utilizadas, parecendo ser o efeito da droga nessas doses mais citotóxico do que anti-proliferativo (Figura13). Esse resultado corrobora com dados da literatura que mostram a ação da sinvastatina em promover apoptose em diversos tipos de células tumorais (KOYUTURK; ERSOZ; ALTIOK, 2007; RELJA *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2009) .

Visto a influência das estatinas sobre a inibição da prenilação de proteínas Rho, culminando na diminuição de sua atividade, interferindo assim nos seus efeitos sobre o citoesqueleto (DENOYELLE *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2008), tornou-se interessante analisar os efeitos da sinvastatina especificamente, sobre a migração das linhagens de glioblastoma humano. Os dados do ensaio de *scratch* mostram que o tratamento com a sinvastatina foi capaz de promover a diminuição da migração celular nas linhagens T98G e U87MG, um comportamento bastante importante tratando-se de linhagens tumorigênicas de alto poder invasivo/migratório. Nesse experimento, o comportamento das duas linhagens foi bastante similar, exceto que a linhagem T98G no controle em 48 horas foi capaz de fechar completamente o espaço entre as lacunas, mostrando ter um potencial migratório maior do que a U87MG, que ainda deixou um pequeno espaço nessas mesmas condições. O trabalho de Wu e colaboradores de 2009 também mostra esse mesmo perfil de migração para o controle da U87MG após 48 horas, bem como a inibição da migração da mesma tratada com sinvastatina na dose de 5 e 10 μ M. Outro dado

importante gerado por esse experimento foi a inibição da migração nas duas doses já após 24 horas de tratamento, o que mostrou que apesar da sinvastatina não reduzir a viabilidade nesse tempo, a migração já é comprometida.

Tendo em vista os resultados fenotípicos nas células de glioma que evidenciam a redução da viabilidade, parada na progressão do ciclo e inibição da migração celular ocasionada pelo tratamento com a sinvastatina, a próxima etapa do trabalho teve como foco a influência das metaloproteinases de matriz e seus inibidores no comportamento anti-invasivo já descrito para a sinvastatina. Na literatura, a grande parte dos trabalhos enfatiza a ação das proteínas Rho nos efeitos provocados pela sinvastatina, mas muito pouco se sabe sobre a ação das estatinas sobre as MMPs, TIMPs e RECK (IZIDORO-TOLEDO *et al.*, 2011). Sendo assim, o próximo passo foi avaliar se o tratamento com a sinvastatina foi capaz de modular a expressão dessas moléculas, e para isso utilizamos a técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Os resultados obtidos para as MMPs mostram também uma diferença bastante grande de resposta entre as linhagens, onde o tratamento das células U87MG com 1 e 5 μ M de sinvastatina foi capaz de aumentar a expressão da MMP2, e aumentar a expressão da MMP9 e MT1-MMP na dose de 1 μ M também nessa linhagem, sendo esses aumentos aproximadamente duas vezes (figura 17). A elevação na expressão da MMP2 na linhagem U87MG não refletiu no aumento de sua atividade, determinada por zimografia gelatinosa (Figura 24). Já na linhagem T98G, a sinvastatina não modulou a expressão de MMP2, diminuiu a expressão de MMP9 e aumentou somente na dose de 5 μ M a expressão de MT1-MMP, um aumento também de aproximadamente duas vezes (Figura 17). Os dados de zimografia ainda mostram que a atividade de MMP2 também não foi modulada pelo tratamento com a sinvastatina nas células T98G (Figura 24). Não foi possível determinar por esse método a atividade de MMP9, pois nos diversos testes não conseguimos detectar nenhuma banda referente à atividade dessa MMP, entretanto, a presença de MMP9 nas linhagens utilizadas permanece controversa, pois alguns artigos discriminam a presença dessa MMPs nas linhagens T98G e U87MG, mas outros relatam sua ausência (Revisado por HAGEMANN *et al.*, 2012).

Os resultados de expressão dos inibidores de MMPs foram bastante interessantes. De modo geral, os níveis de mRNA dos inibidores tissulares solúveis

clássicos das MMPs (TIMPs) aumentou nitidamente em ambas as linhagens após o tratamento com a sinvastatina (Figura 18). Especificamente, os níveis de expressão das TIMPs 2, 3 e 4 foram quase três vezes maior na dose de 5 μ M na linhagem U87MG, com uma grande tendência ao aumento da TIMP1, porém sem significância estatística. Na linhagem T98G também houve um aumento bastante acentuado na expressão da TIMP1, 3 e 4 na dose de 5 μ M, com tendência visível de aumento de TIMP2, também na dose de 5 μ M. É importante ressaltar que o tratamento com sinvastatina foi capaz de aumentar de maneira estatisticamente significativa, ou mostrando uma tendência clara ao aumento, a expressão de todas as TIMPs nas duas linhagens estudadas.

Ainda, foi avaliado se o tratamento com a sinvastatina alterava a razão de expressão de mRNA a favor das TIMPs em relação as MMPs (figuras 19 e 20). As análises das razões, resumida na Tabela 5, ajudam ainda mais a demonstrar que, no geral, o tratamento com a sinvastatina está alterando a expressão a favor dos inibidores. É importante enfatizar que o tratamento com a sinvastatina alterou de forma uniforme a expressão de todas as TIMPs em relação à MMP9, uma MMP bastante envolvida no processo invasivo de glioblastomas (CHINTALA *et al.*, 1999; Hagemann *et al.*, 2012). Ainda, houve um aumento na grande maioria das razões referentes às TIMPs 3 e 4, na dose de 5 μ M nas duas linhagens (U87MG e T98G), indicando que essas TIMPs particularmente podem estar tendo um importante papel no fenótipo anti-invasivo da sinvastatina. Vale lembrar que a TIMP3, dentre todas as TIMPs é a que possui um maior espectro de inibição, e que a TIMP4 é capaz de inibir de maneira acentuada a maioria das MMPs (revisado por Hagemann *et al.*, 2012). A modulação da expressão de TIMP1 sugere ser mais relevante para a linhagem T98G, onde teve sua razão aumentada em relação às MMPs 2 e 9. Já a TIMP2 teve suas razões aumentadas somente sobre a MMP9, nas duas linhagens e na dose de 5 μ M.

Deste modo, é possível sugerir que a célula tumoral esteja respondendo à ação da sinvastatina aumentando a expressão das MMPs, tentando manter seu fenótipo invasivo característico, porém o tratamento esteja atuando em outras vias aumentando muito mais a expressão das TIMPs, fazendo com que o saldo seja positivo à favor dos inibidores (demonstrado pela razão TIMPs/MMPs – Figuras 19 e 20, e Tabela 5), revelando que as TIMPs podem ser um importante alvo no fenótipo anti-invasivo atribuído à sinvastatina. Lembrando que esse comportamento anti-

invasivo das estatinas já foi descrito e caracterizado em diversos modelos de tumores *in vitro*, como glioma, carcinoma de mama, células tumorais de pâncreas, tireoide e em modelo de melanoma. No modelo *in vivo* utilizando ratos, esse fenótipo foi confirmado em tumores carcinomas de cólon, pâncreas, mama, renais e melanoma (revisado por OSMAK, 2012).

Sobre o inibidor de MMPs ancorado à membrana, RECK, o tratamento com a sinvastatina não foi capaz de alterar a expressão do transcrito canônico (RECK A), mas foi capaz de aumentar discretamente os seus níveis protéicos. Outro dado interessante gerado neste trabalho é o perfil oposto de expressão de RECK A (canônico) em relação à RECKB. Foi visto também, em trabalhos do nosso grupo, uma diminuição do transcrito RECKB por Barbosa em 2010 em linhagens de melanoma humano (SK-MEL28) tratadas com 1 e 5 μ M de sinvastatina por 72 horas, e também por Amstalden em 2011 em células de glioma humano U373MG após 48 horas de tratamento com 50 μ M do flavonóide quercetina.

Ainda, análises das razões de expressão de RECKA/RECKB sugere que o tratamento das células U87MG e T98G com a sinvastatina está sendo capaz de alterar de alguma maneira o *splicing* a favor da isoforma canônica. É importante lembrar que este transcrito alternativo (RECK B) codifica para uma proteína com possível ancoramento GPI, semelhante à proteína canônica (LIMA *et al.*, 2010). Levando em consideração que transcritos alternativos de um gene podem apresentar funções diferentes e até antagônicas, e de que a presença da cauda GPI sugere que estas duas proteínas possam estar atuando no mesmo local da membrana celular, e é possível que haja uma regulação celular diferenciada ou até oposta para essas duas isoformas de RECK. O transcrito B de RECK codifica para um produto protéico truncado (perde-se os domínios inibidores de serina protease e o domínio kazal) em relação à proteína canônica, e à partir disso, pode-se inferir que a ação de RECK B não seja diretamente sobre as metaloproteinases de matriz (como já é descrito para RECK A), sugerindo que esta pode estar exercendo outra função na célula. O conjunto dessas informações nos permite indicar que talvez RECK B esteja de alguma forma competindo com RECK A pelo mesmo sítio de localização na membrana plasmática, e que a sinvastatina esteja de alguma forma alterando o *splicing* a favor de RECKA. Esse fato torna-se importante devido à relação que RECKB tem com um fenótipo maligno, visto que Jacomasso em 2010 e

Lima em sua tese de doutorado correlacionaram uma maior razão RECKB/RECKA com as linhagens mais invasivas de melanoma quando comparada com as linhagens menos malignas (Jacomasso, 2010), e a uma menor taxa de sobrevivência em pacientes com glioblastoma multiforme (Lima et al., dados submetidos a publicação). Posto isso, concluímos que as perspectivas abertas a respeito da regulação do *splicing* alternativo e diminuição de RECKB, mostram-se bastante interessantes de serem esclarecidas futuramente.

Os *lipid rafts* são regiões de membrana ricas em colesterol, muito importantes na sinalização celular, estando envolvidas em diversos processos de transdução de sinal. Em vários casos a função das proteínas depende grandemente de sua associação com os *lipid rafts* (GEORGE & WU, 2012). Sabendo que RECKA apresenta ancoramento GPI (TAKAHASHI *et al.*, 1998) e que está preferencialmente localizado nos *lipid rafts* (OMURA *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2011), e que as estatinas são capazes de causar a disrupção desses micro domínios alterando a localização de muitas moléculas ali presentes (WU *et al.*, 2009) fica evidente a importância da análise da localização dessa proteína após o tratamento com esse composto, visando contribuir para o conhecimento da real contribuição de RECK na ação anti-invasiva das estatinas. Para isso, primeiro realizou-se o fracionamento das membranas resistentes a detergentes, e posterior *western blotting* para a proteína RECK e também para a flotilina, uma proteína que se encontra quase que somente nos *lipid rafts*, utilizada como marcador (ZHUANG, L. *et al.*, 2005). O tratamento das células U87MG com 1 μ M de sinvastatina foi capaz de causar a disrupção dos rafts, caracterizado pelo espalhamento da flotilina pelas frações isoladas da membrana, sendo também responsável por alterar completamente a localização de RECK, que encontrava-se antes do tratamento nas regiões dos *rafts* como já descrito na literatura (frações 1 e 2), e que depois foi localizada nas frações 6 e 7 (Figura 25).

Esses resultados sugerem que a proteína RECK canônica não esteja realizando suas funções como inibidor de MMPs de maneira plena por não estar localizada no seu local de origem. Já foi descrito que proteínas podem perder suas funções quando não mais presentes nesses micro domínios ricos em colesterol (BANG *et al.*, 2005), não sendo interessante em termos energéticos para a célula regular a expressão dessa proteína (visto que o aumento dos níveis protéicos foram bem tênues – Figura 23), pois aparentemente ela não parece ser um dos principais alvos da ação anti-invasiva da droga.

Levando em consideração as informações já existentes na literatura, em conjunto com os novos dados gerados nesse trabalho, propusemos um modelo que mostra a contribuição das TIMPs e RECKB para a contenção da invasão em células de glioma humano, demonstrada na figura 26.

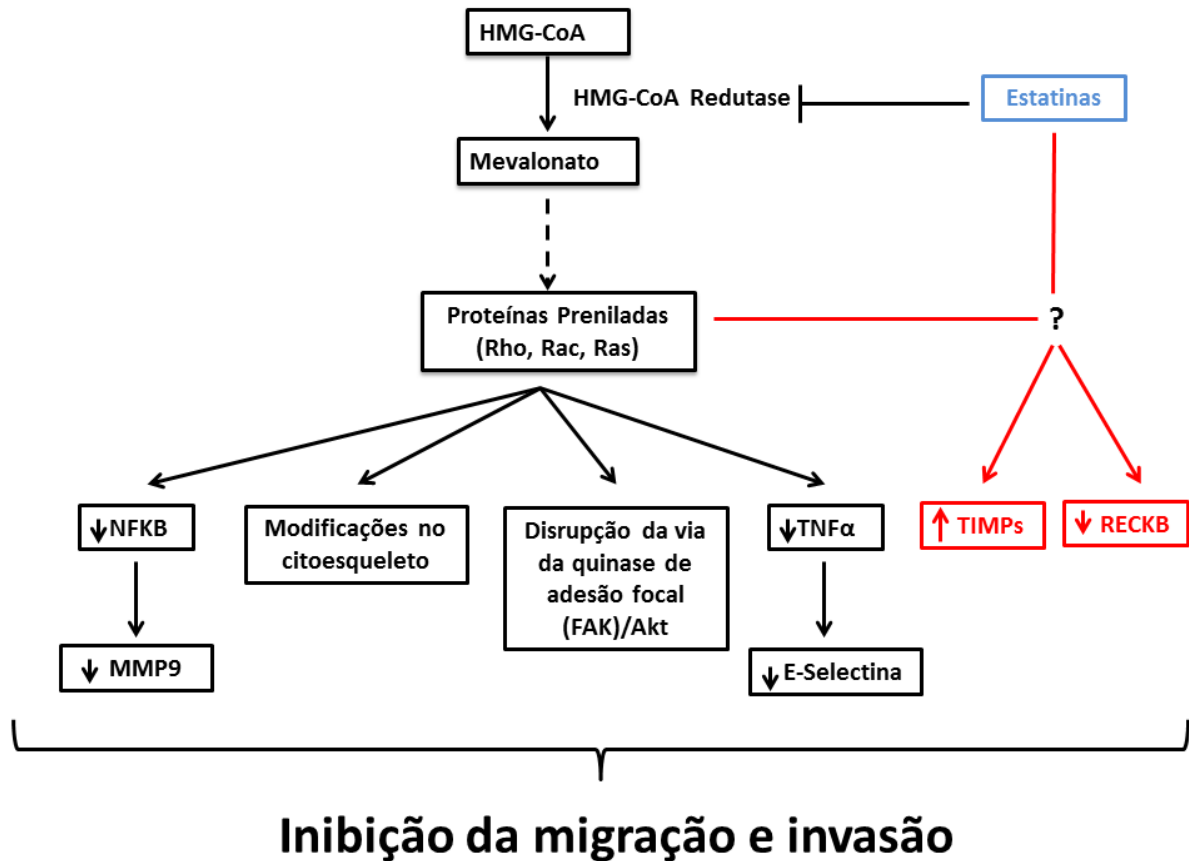


FIGURA 26: PROPOSTA DA CONTRIBUIÇÃO DO AUMENTO DE TIMPs E DIMINUIÇÃO DE RECKB NA CONTENÇÃO DA INVASÃO EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO. NFKB indica o fator nuclear KB; MMP9 indica a metaloproteinase de matriz 9; TNF α indica o fator de necrose tumoral α ; TIMPs indica os inibidores tissulares clássicos das MMPs. Em vermelho as contribuições feitas por esse trabalho. FONTE: O AUTOR (2013)

O modelo proposto na Figura 26 mostra em preto o que a literatura apresenta como fatores responsáveis pela contenção da invasão celular gerada pelas estatinas em diversos modelos. Primeiramente, Denoyelle e colaboradores em 2001 demonstraram que o tratamento com 25 ng/mL de cerivastatina diminuiu a invasão em substrato de matrigel® em células de mama MDA-MB-231. Nesse mesmo modelo, utilizando o ensaio de supershift, também mostrou que a cerivastatina foi capaz de diminuir a capacidade do fator de transcrição NFKB de ligar-se ao DNA, culminando na diminuição da transcrição e atividade da MMP9 após 36 horas de tratamento. Ainda nesse trabalho, foi descrita a modificação na

morfologia das células MDA-MB-231 após o tratamento com 25 ng/mL de cerivastatina por 48 horas, onde as células encontraram-se mais arredondadas e com finos prolongamentos de membrana, bem similar ao fenótipo encontrado em nosso trabalho nas células de glioma (U87MG e T98G). Esse fenótipo foi totalmente revertido pela adição de geranylgeranyl pirofosfato, indicando a importância da ação das estatinas sobre as proteínas Rho nesse processo (Figura 26).

Em 2003 um trabalho do mesmo grupo, também realizado por Denoyelle e colaboradores, mostrou a inibição da translocação de RhoA do citoplasma para a membrana mediada por cerivastatina (na dose de 25ng/mL) em células de mama MDA-MB-231, indicando que a ação dessa proteína está comprometida, visto que ela precisa estar associada a membrana para exercer suas funções corretamente. Esse trabalho também mostrou que o tratamento com cerivastatina não foi capaz de alterar a transcrição da quinase de adesão focal (FAK), porém, sua fosforilação (dependente de RhoA) foi diminuída rapidamente, após 6 horas de tratamento. A fosforilação de AKT também foi diminuída após o tratamento nesse mesmo tempo, sendo completamente inibida após 12 horas, indicando que a cerivastatina é capaz de alterar as funções dessa via, tão importante para a invasão (Figura 26).

A E-Selectina é uma proteína de membrana que auxilia no extravasamento e invasão de células tumorais, e Nubel e colaboradores em 2004 demonstraram que a lovastatina foi capaz de diminuir pela metade a expressão de E-Selectina mediada por TNF α na dose de 100nM em HUVECs. Esse trabalho ainda mostrou uma diminuição dose-dependente causada pela lovastatina na adesão de células de carcinoma de cólon, e essa diminuição foi proporcional à diminuição da expressão de E-Selectina mediada por TNF α , demonstrando que o tratamento com essa estatina pode atuar no bloqueio da adesão celular, processo importante para invasão e migração tumoral (figura 26)

No modelo proposto pela figura 26, destacamos algumas das vias mais importantes relacionadas ao efeito anti-invasivo e anti-migratório das estatinas. Em vermelho destaca-se a contribuição realizada pelo presente trabalho, que mostra o possível envolvimento dos inibidores das MMPs (principalmente das TIMPs) e de RECKB no mecanismo de ação antitumoral mediado pela sinvastatina. Como perspectiva, ressaltamos a necessidade de maiores estudos para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nesse aumento, se ele é ocasionado

diretamente pela ação das estatinas sobre algum outro alvo ainda desconhecido, ou se é através de sua importante interferência na ação das proteínas Rho. Ainda, é interessante a possibilidade de estudos funcionais regulando a expressão de TIMPs e RECKB em modelos celulares de glioma humano para comprovar se estes são alvos essenciais no mecanismo de ação da droga.

7 CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho mostram que:

- As imagens geradas por microscopia de contraste de fase mostram uma alteração significativa na morfologia e desaderência das células de glioma (T98G e U87MG) principalmente após 48 horas de tratamento com sinvastatina.
- A sinvastatina foi capaz de reduzir a viabilidade celular a partir de 48 horas de tratamento, de maneira tempo e dose-dependente na linhagem T98G e tempo-dependente na linhagem U87MG, sendo o efeito citotóxico em 72 horas ainda mais pronunciado.
- O tratamento com sinvastatina em ambas as doses (1 e 5 μ M) promoveu parada do ciclo celular na fase G1 com concomitante diminuição na fase S nas células U87MG, não tendo efeito sobre a progressão do ciclo na linhagem T98G.
- A migração celular é inibida nas duas linhagens já após 24 horas de tratamento com a sinvastatina, e esta ocorre de maneira tempo e dose-dependente em ambas as linhagens de glioblastoma humano.
- Não houve modulação da expressão do transcrito canônico RECKA após o tratamento com a sinvastatina nas células T98G e U87MG.
- Ocorre diminuição estatisticamente significativa do transcrito RECKB após tratamento das duas linhagens de glioma humano com sinvastatina na dose de 5 μ M.
- Houve um aumento na razão de RNA mensageiro de RECKA em relação à RECKB na dose de 5 μ M nas linhagens U87MG e T98G.
- Foi visto um aumento nos níveis de mRNA de MMP2 após o tratamento com sinvastatina nas doses de 1 e 5 μ M, e um aumento de MMP9 e MT1-MMP apenas na dose de 1 μ M na linhagem U87MG.
- Na linhagem T98G, foi observado um aumento nos níveis de mRNA apenas de MT1-MMP na dose de 5 μ M, sem modulação da MMP2, e com diminuição dos níveis de MMP9 também na dose de 5 μ M.

- Houve um aumento bastante pronunciado na expressão da TIMP3 e 4 nas duas linhagens, sendo esses na dose de 5 μ M de sinvastatina para a T98G, e nas duas doses para a U87MG.

- Os níveis de mRNA foram aumentados também para a TIMP1 após o tratamento com 5 μ M de sinvastatina na T98G, com tendência clara de aumento da TIMP2 nessa linhagem; Ainda, ocorreu um aumento estatisticamente significativo para a TIMP2 nas doses de 1 e 5 μ M, com tendência de aumento nítida para a TIMP1.

- No geral, houve um aumento significativo nas razões de expressão de mRNA à favor das TIMPs em relação às MMPs. Para a linhagem U87MG, esse aumento foi estatisticamente significativo na dose de 1 μ M na razão TIMP3/MMP9, e na dose de 5 μ M nas razões TIMP2, 3 e 4 em relação à MMP9, e TIMP 3 e 4 em relação à MT1-MMP.

- Ainda sobre as análises das razões, agora para a linhagem T98G, houve um aumento nas razões TIMP1/MMP2 nas doses de 1 e 5 μ M. Na dose de 5 μ M houve um aumento nas razões de todas as TIMPs em relação a MMP9, e nas TIMPs 3 e 4 em relação a MMP2.

- Não houve alteração na atividade de MMP2 em ambas as linhagens de glioma humano após tratamento com sinvastatina.

- O tratamento com a sinvastatina aumentou levemente a expressão da proteína RECK nas duas linhagens de glioma utilizadas neste trabalho.

- A sinvastatina foi capaz de causar a interrupção dos micro domínios ricos em colesterol, chamados *lipid rafts*, alterando completamente a localização da proteína RECK na membrana das células U87MG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIMES, R.T. & QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **J Biol Chem**, v.270, p.5872-5876,1995.
- AKBASAK, A.; SUNAR- AKBASAK, B. Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumours.**J. Neurol. Sci**, v.111, p.119-133,1992.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AMERICAN CANCER SOCIETY.Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: 26 jan 2013.
- American Medical Association. Drug Evaluations, p. 2486. 1995.
- AMSTALDEN, H.G. **Efeitos da quercetina em células de glioma humano: Envolvimento das metaloproteínas de matriz e seus inibidores**.133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ARGAWAL,B. *et al.* Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 2223–2229, 1999.
- BABABEYGY, S.R. *et al.* HMG-CoA reductase inhibition causes increased necrosis and apoptosis in an in vivo mouse glioblastoma multiforme model. **Anticancer Res**, v.29, p. 4901-8, 2009.
- BAKER, A. H.; EDWARDS D. R.; MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.**J Cell Sci**, v. 115, p. 3719-3727, 2002.
- BANG, B.; GNIADDECKI, R.; GAJKOWSKA, B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. **Exp. Dermatol**, v.14,p. 266–272, 2005.
- Barbosa, F. A. L. **Efeito da sinvastatina na modulação da expressão de RECK e suas isoformas em células de melanoma humano**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 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, p.731-738, 1996.
- BELLAIL, A. C. *et al.*Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. **Int J Biochem Cell B**, v. 36, p. 1046–1069, 2004.
- BODE, W. *et al.* Insights into MMP–TIMP Interactions. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 878, p.73-91, 1999.
- BOSMAN, F.T. & STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix.**J Pathol**, v.200, p. 423-428, 2003.

BRADL, M.; LASSMAN, H. Oligodendrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, p. 37–53, 2010.

BREW K.; DINAKARPANDIAN D., NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1477, p. 267-283, 2000.

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

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, p. 1061-8, 2008.

CHAN, K. K.; OZA, A. M.; SIU, L. L. The statins as anticancer agents. **Clin Cancer Res**, v.9, p.10-19, 2003.

CHINTALA, K. S.; TONN, J.C.; RAO, J.S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. **Int J. Dev Neuroscience**, v.17, p.495-502, 1999.

CHINTALA, S. K.; TONN, J. C.; RAO, J.S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. **Int J Dev Neurosci**, v. 17, p. 495–502, 1999.

CHUNG A, S. *et al.* H. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, v. 36, p.128-137, 2003.

CLARK, E. A. *et al.* Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. **J Cell Biol**, v. 142, p. 573-86, 1998.

CLARK, M. J. *et al.* U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. **PLoS Genet**, v. 6, 2010.

CLARK, P. A ; LLANOS, S.; PETERS, G. Multiple interacting domains contribute to p14^{ARF} mediated inhibition of MDM2. **Oncogene**.2002 v. 21, p. 4498-507, 2002.

COLISSON, E. A. *et al.* Isoprenylation is necessary for the full invasive potential of RhoA overexpression in human melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v.119, p. 1172-1176, 2002.

CORREA, T. C. S. *et al.* Downregulation of the RECK-Tumor and Metastasis Suppressor Gene in Glioma Invasiveness. **J Cell Biochem**, v. 99, p. 156 – 167. 2006.

CORREA, T. C. S. *et al.* RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **J Cell Biochem**, v.110, p. 52-61, 2010.

DAVIDSON, A. N. Brain sterol metabolism. **Adv Lipid Res**, v.3, p.171–196, 1965.

DEL BIGLIO, M. R. Ependymal cells: biology and pathology, **Acta Neuropathol**, v. 119, p.55-73, 2010

DEMIERRE, M. F. *et al.* Statins and cancer prevention. **Nat Rev Cancer**, v.5, p. 930-942, 2005

DEMUTH, T.; BERENS, M.E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol**, v.70, p. 217-228, 2004.

DENOYELLE, C. et al. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study, **Carcinogenesis**, v.22, p.1139–1148, 2001.

DENOYELLE, C. *et al.* Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. **Cell Signal**, v.15, p. 327–338, 2003.

EISENBERG, I. *et al.* Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. **Cytogenet Genome Res.**, v. 97, p.58-61, 2002.

FERRIS, J. S. *et al.* HMG CoA reductase inhibitors, NSAIDs and risk of glioma. **Int J Cancer**, v. 15, p. 1031-7, 2012.

FILLIPINI, G. Epidemiology of primary central nervous system tumors. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 104 (3rd series), 2012.

FILLMORE, H. L.; VANMETER, T. E.; BROADDUS, W. C. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. **J Neurooncol.**, v. 53, p.187-202, 2001.

FRÖLICH, E. Proteases in cutaneous malignant melanoma: relevance as biomarker and therapeutic target. **Cell Mol Life Sci.**, v.6, p.3947-60, 2010.

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, p.189-195, 2001.

GEORGE K. S.; WU, S. Lipidraft: A floating island of death or survival. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.15, p. 311-92012, 2012.

GLIEMROTH, J. *et al.* Migration, proliferation, and invasion of human glioma cells following treatment with simvastatin. **Neurosurg Rev.**, v. 26, p.117–124, 2003.

HAGEMANN, C. *et al.* A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. **J Clin Oncol**, v.3, p. 67-79, 2012.

HATTA, M. *et al.* Density- and serum-dependent regulation of the Reck tumor suppressor in mouse embryo fibroblasts. **Cell Signal**, v. 21, p.1885–1893, 2009.

HONG, K.J. *et al.* The tumor suppressor RECK interferes with HER-2/Neu dimerization and attenuates its oncogenic signaling. **FEBS Letters**, v. 585, p. 591–595, 2011.

HOSHI, M. *et al.* Antitumoral effects of defective herpes simplex virus-mediated transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene in malignant glioma U87 in vitro: consequences for anti-cancer gene therapy. **Cancer Gene Ther.**, v. 7, p.799-805, 2000.

HULLEMAN, E.; HELIN, K. Molecular mechanisms in gliomagenesis. **Adv Cancer Res**, v. 94, p.1-27, 2005.

HYNES, R.O. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. **Science**, v. 326, p.1216 – 1219, 2009.

ITOH, Y. & NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochem**, v.38, p.21-36, 2002.

IZIDORO-TOLEDO, T.; GUIMARÃES, D.; BELO, V. A.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J.E. Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.**, v. 383, p. 547–554, 2011

JACOMASSO, T. **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.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KNOX, J. J. *et al.* A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) and of the cervix. **Proceedings of the 2001 AACR-NCI-EORTC International Conference**, p. 71, 2001.

KOUL, D. *et al.*, Cellular and in vivo activity of a novel PI3K inhibitor, PX-866, against human glioblastoma. **Neuro Oncol**, v.12, p. 559-69, 2010.

KOYUTURK, M.; ERSOZ, M.; ALTIOK, N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. **Cancer Lett**, v. 8;250, p. 220-8, 2007.

KOYUTURK, M.; ERSOZ, M.; ALTIOK, N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. **Neurosci Lett**, v. 370, p. 212-7, 2004.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Mol Cancer**, v.9, 2010.

KRAWCZYK, A.; JAWORSKA-ADAMU, J. Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes. **Folia Histochem Cytobiol.**, v. 48, p.173-177, jan. 2010

KWIATKOWSKA, A. ; SYMONS, M. Signaling determinants of glioma cell invasion. **Adv Exp Med Biol**, 2013.

LAKKA, S. S.; GONDI, C. S.; RAO, J. S. Proteases and glioma angiogenesis. **Brain Pathol.**, v. 14, p.327-341, 2005.

LEVINSKI, R.J.; BROWN, H. Statins. Too many people are taking them (and they're doing far less good than you think). **Lancet**, v. 69, p. 268–269, 2007.

- LI, W.; LI, Z.; SUN, X. Statins suppress MMP2 secretion via inactivation of RhoA/ROCK pathway in pulmonary vascular smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol**, v.591, p.219-223, 2008.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc.**, v. 2, p.329-333, 2007.
- LIMA, M.T.; WINNISCHOFER, S. M. B.; CARREIRA, A. C. O.; DEMASI, M.A.A.; COLIN, C.; SOGAYAR, M.C. Isolation and characterization of three novel isoforms of the *RECK* tumor suppressor gene. **Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, Águas de Lindóia, 2009.
- LIU, L.T. *et al.* Induction of RECK by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in lung cancer cells. **Oncogene**, v. 21, p.8347-8350, 2002.
- 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, p. 402-8, 2001.
- LÓPEZ-AGUILAR, *et al.* Security and maximal tolerated doses of fluvastatin in pediatric cancer patients. **Arch Med Res**, v. 30, p. 128-31, 1999.
- MAHER, E. A.; FURNARI, F.B.; BACHOO, R.M.; ROWITCH, D.H.; LOUIS D.N.; CAVANEE W.K.; DEPINHO R.A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev**, v.15, p.1311-1333, 2001.
- MASUI, T. *et al.* RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. **Clin Cancer Res** v.9, p.1779-1784, 2003.
- MENG, N. *et al.* RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histol Histopathol**, v. 23, p.1003-1010, 2008.
- MINNITI, G. *et al.* Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. **Anticancer Res.**, v. 29, p.5171-5184, 2009.
- MISIRKIC, M.; *et al.* Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro anti-glioma effect of simvastatin. **Pharmacol Res.**, v. 65, p. 111-9, 2011.
- MIURA, K.; FUJIBUCHI, W.; UNNO, M. Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, p. 2311-9, 2012.
- MONTGOMERY DL. Astrocytes: form, functions and role in disease. **Vet Pathol.** v. 3, p.145-167, 1994.
- NAGASE, H.; MURPHY, G. Tailoring TIMPs for selective metalloproteinase inhibition, **The Cancer Degradome**, p. 787–810, 2008.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, p. 562-573, 2006.
- NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 274, p. 21491-21494, 1999.

NAJIBA, N. M. *et al.* Pharmacokinetics and Bioequivalence Evaluation of Two Simvastatin 40mg Tablets (Simvast & Zocor) in Healthy Human Volunteers **Biopharm Drug Dispos**, v.24, p.183–189, 2003.

NAKADA, M. *et al.* Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. **J Neurosurg.**, v. 94, p.464-473, 2001.

NAKADA, M.; OKADA, Y.; YAMASHITA, J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. **Frontiers In Bioscience**, v. 8, p.261-269, 2003.

NAKAGAWA, T. *et al.* Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase/type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. **J Neurooncol**, v.28, p. 13-24, 1996.

NAKAMURA, H. *et al.* Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. **Cancer Res.**, v. 59, p.467-473, 1999.

NARUMIYA, S.; TANJI, M.; ISHIZAKI, T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. **Cancer Metastasis Rev**, v.28, p. 65–76, 2009.

NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY. Disponível em: <<http://www.brainumor.org/>>. Acesso em: 26 jan 2013.

NODA, M. *et al.* RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, p.167-175, 2003.

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

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

NUBEL, T. *et al.* Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNF α and attenuates tumor cell adhesion. **FASEB J**, v. 18, p.140–142, 2004.

OH, J. *et al.* The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. **Cell**, v. 107, p.789-800, 2001.

OH, J. *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, p. 789-800, 2001

OHGAKI H *et al.* Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res**, v. 64, p. 6892–6899, 2004.

OHKA, F.; NATSUME, A.; WAKABAYASHI, T. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. **Neurol Res Int**, v. 2012, 2012.

OMURA, A. *et al.* RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. **J Biol Chem**, v.284, p. 3461-3469, 2009.

OSBORNE, R.H.; HOUBEN, M.P.; TIJSSEN, C.C.; COEBERGH, J.W.; VAN DUIJN, C.M. The genetic epidemiology of glioma. **Neurology**, v.57, p.1751-1755, 2001.

OSMAK, M. Statins and cancer: Current and future prospects. **Cancer Letters** v.324, p. 1–12, 2012.

PARK, J. B.; KWAK, H. J.; LEE, S. H..Role of hyaluronan in glioma invasion. **Cell Adh Migr**, v. 2, p.202-207, 2008.

PLANCHENAUT, T. *et al.* Differential expression of laminin and fibronectin and of their related metalloproteinases in human glioma cell lines: relation to invasion. **Neurosci Lett.**, v. 299, p.140-144, 2001.

POINCLOUX, R.; LIZÁRRAGA, F.; CHAVRIER, P.. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. **J Cell Sci.**, v. 122, p.3015-3024, 2009.

PORTER, K.E. *et al.* Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP9 secretion: inhibition by simvastatin. **Cardiovasc Res**, v.64, p. 507-515, 2004.

PRASANNA, P. *et al.*Lipid metabolism as a target for brain cancer therapy: synergistic activity of lovastatin and sodium phenylacetate against human glioma cells. **J Neurochem**, v. 66, p. 710–716, 1996.

RABIEN, A.; *et al.* RECK Overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 9, p. 948-54, 2011.

RAFFETTO, J. D.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochem.Pharmacol.**,v. 75, p. 346-359, 2008.

RAO, J. S. Molecular Mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat Rev Cancer.**, v. 3, p.489-501, 2003.

RELJA B. *et al.* Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells. **Int J Mol Med**, v. 26, p. 735-41, 2010.

SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. RHO-GTPases and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 133-42, 2002.

SAITO, A. *et al.* Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells. **Melanoma Res**, v. 18, p. 85-94, 2008.

SASAHARA, R. M. *et al.*Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detect Prev.**, v. 26, p.435-443, 2002.

SHANNON R.P.; SAYRE J.W.; SAYRE J.J. Patterns of care for adults with malignant glioma. **JAMA**, v.293, p.2469-2470, 2005.

SHIMADA, T. *et al.* Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. **Clin Exp Metastasis.**, v. 18, p.179-188, 2000.

SIMIZU, S. *et al.* RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. **Cancer res**, v.65, p.7455-7461, 2005.

SOMA, M. R. *et al.* In vivo enhanced antitumor activity of carmustine [N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea] by simvastatin. **Cancer Res**, v.55, p.597-602, 1995.

SOMA, M. R. *et al.* PKC activity in rat C6 glioma cells: changes associated with cell cycle and **simvastatin** treatment. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 200, p. 1143-9, 1994.

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, p. 2710-2715, 2003.

STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p. 463-516, 2001.

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, p.5331-5338, 1995.

TAKAGI, S., SIMIZU, S., OSADA, H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. **Cancer Res**, v. 69, p. 1502-8, 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.**, v. 95, p.13221-13226, 1998.

TAKEDA, I. *et al.* Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signalin and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Cancer Sci**, v.98, p.890-899, 2007.

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, p. 817–824, 2005.

TAKEUCHI T. *et al.* The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v.10, p. 5572–5579, 2004.

TAKINO T. *et al.* Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. **Cancer Res**, v. 64, p. 1044-1049, 2004.

TÁPIA-PERES, J. H. *et al.* Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 67, p.1193–1201, 2011.

TREMBLAY M. *et al.* The Role of Microglia in the Healthy Brain. **J Neurosci**, v. 31, p.16064 –16069, 2011.

TURNER, N.A. *et al.* Simvastatin inhibits MMP9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP9 mRNA levels. **FASEB J**, v.19, p.804-806, 2005.

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, 2002.

VEGA, F. M.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Letters**, v. 582, p. 2093–2101, 2008.

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

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, v. 14, p. 2123-2133, 2000.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WELM, B.; MOTT, J.; WERB, Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. **Curr Biol.**, v. 12, p.R209-211, 2002.

WICK, W.; POÇOER, M.; WEILER, M.; BATCHELOR, T.; YUNG, A. W. K.; PLATTEN, M. Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 13, pg. 566-579, 2011.

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**. 2005. 152 f. Tese (Doutoramento) - Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

WU, H. *et al.* Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. **Neurosurgery**, v.65, p.1087-1096, 2009

YU, W. H. *et al.* TIMP- 3 binds to sulphated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. **J. Biol.Chem**, v. 275, p. 31226-31232, 2000.

ZHUANG, L. *et al.*Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. **J Clin Invest**, v. 115, p.959-68, 2005.