

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES DE MIGRAÇÃO E ADESÃO  
CELULAR EM TUMORES NEUROEPITELIAIS DE ADULTOS E  
CRIANÇAS**

**FÁBIO JOSÉ NASCIMENTO MOTTA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências, área de  
concentração Genética

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE**

M921p

Motta, Fábio José Nascimento

Perfil da expressão dos genes de migração e adesão celular em tumores neuroepiteliais de adultos e crianças / Fábio José Nascimento Motta. – Ribeirão Preto, 2008.

122 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone.

1. Genética Molecular. 2. Sistema Nervoso Central – Câncer. 3. Tumores Cerebrais. 4. Expressão Gênica. I. Título.

CDD – 574.873 28

## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

Este estudo foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- ✓ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Proc 04/12133-6)
- ✓ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq
- ✓ Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP/USP- FAEPA
- ✓ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP
- ✓ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

## FOLHA DA APROVAÇÃO

Fábio José Nascimento Motta

Perfil da expressão dos genes de migração e adesão celular  
em tumores neuroepiteliais de adultos e crianças

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética

Aprovado em:

### **Banca examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

**"As ciências têm as raízes amargas, porém os frutos são doces."  
(Aristóteles)**

**"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si. Levam um pouco de nós."  
(Antoine de Saint Exupéry)**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone, orientador, mestre e amigo pela oportunidade e confiança em mim depositada ao longo desses quatro anos de convívio, pela torcida, apoio e por se mostrar um exemplo de profissional dedicado à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli pela paciência, pelas discussões e por me ensinar um pouco mais sobre a “boa ciência” e sempre ter me estendido a mão nos momentos difíceis.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosane Gomes de Paula Queiroz pela disponibilidade, dedicação, assistência nesses anos de convívio por me receber tão bem no laboratório.

Ao Prof. Dr. Elvis Terceiro Valera, pela valiosa ajuda na interpretação dos dados clínicos histopatológicos dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Hélio Machado, pela coleta do material de estudo e em especial ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr, pela cessão de tecido não neoplásico, de grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sueli Marie e à Prof<sup>a</sup>. Dra Sueli Oba pela cessão de algumas amostras que enriqueceram nosso estudo.

Ao Dr Luciano Neder e Maria Paula, do Departamento de Patologia, pela enorme assistência na microdissecção das amostras.

Aos Docentes do Departamento de Genética da FMRP, em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Catarina Takahashi, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lúcia Martelli e ao Prof. Dr Adelmilson Espencer, pelo exemplo de dedicação à atividade docente, servindo de inspiração para mim e para muitos outros colegas da pós-graduação.

A toda equipe do Laboratório de Pediatria (Karina, Vanessa, Priscila, Maurício, Kleiton, Elvis e Fábio Morato), que sabem trabalhar com alegria e competência. Especialmente aos amigos, conselheiros e fanfarrões, Maria Angélica e Daniel Moreno, que junto comigo viveram momentos filosóficos em Ribeirão Preto.

Aos membros da banca examinadora que gentilmente abriram mão de seu precioso tempo para leitura desse trabalho.

Às funcionárias Maria Aparecida, Suzie Nalon e Cleusa Mazzucatto da secretaria do Departamento de Genética da FMRP-USP, pela atenção e ajuda prestada em todos os momentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa para realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP/USP- FAEPA.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP.

À Maria Cleide Nascimento Motta por toda a dedicação, renúncia e valores repassados que habitam em mim e me servem como exemplo a ser seguido e principalmente por entender minhas escolhas e a privação da nossa convivência diária.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Canalle, esposa amada, amiga e principal incentivadora desse trabalho, e de minha vida, que me faz enxergar tudo mais azul e querer sempre me tornar uma pessoa melhor.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Harada, ex-orientadora, amiga, conselheira agora colega de trabalho pela oportunidade e confiança em mim depositada ao longo desses anos, pela torcida, apoio e pela motivação quando tudo parecia ser maior do que realmente era.

Aos meus irmãos de sangue Flávio e Cíntia e minha sobrinha Fernandinha pelo incentivo e torcida.

Aos amigos, irmãos e agora colegas de trabalho na UFPI Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima e Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto por todo o apoio e a ensinarem a viver em comunidade e a crescer como pessoa.

Ao meu amigo Márcio Rogério Penha por toda sua solicitude e pelo muitos momentos divertidos que compartilhamos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> France Keiko pela ajuda na coordenação do curso de Biomedicina do CMRV.

À Dra Ciane pelo apoio.

Aos amigos Plínio, Verônica e Marcelo Bahia pela hospitalidade em Ribeirão Preto e pelo apoio e momentos agradáveis vividos nessa etapa da minha vida.

E aos meus estimados amigos de Belém do Pará, por entenderem minha ausência e pela torcida.

Às amigas que fiz em Parnaíba Prof<sup>a</sup> Rejane e a Gilvânia Chaves que deixam o ambiente de trabalho bem mais agradável pela torcida e confiança em mim depositada.

A Deus por me permitir viver e aproveitar grandes momentos de minha vida que me motivam a combater um bom combate.



## RESUMO

### PERFIL DA EXPRESSÃO DOS GENES DE MIGRAÇÃO E ADESÃO CELULAR NOS TUMORES NEUROEPITELIAIS DE ADULTOS E CRIANÇAS.

**Introdução:** As metaloproteinases de matriz, seus inibidores teciduais e as caderinas possuem importância crítica na evolução e progressão dos tumores cerebrais. Estudos têm demonstrado que alterações na expressão dos genes de migração e adesão celular são envolvidas na evolução clínica dos tumores neuroepiteliais. **Métodos:** Avaliamos 81 tumores, sendo 62 astrocitomas: 21 de grau I, 10 de grau II, 10 de grau III e 21 de grau IV - glioblastoma) e 19 meduloblastomas, de pacientes admitidos no HCFMRP-USP e mais cinco amostras de tecido cerebral não neoplásico. A expressão dos genes *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-14*, *TIMP-1*, -2, -3, -4 e *CDH1* foi mensurada por PCR em Tempo Real. Para análises estatísticas utilizamos os testes Kruskal-Wallis e Kaplan-Meir. **Resultados:** A expressão dos genes *MMP-2* e *MMP-3* não diferiram entre os tumores estudados. Expressão elevada de *MMP-9* e *MMP-14* foi detectada nos tumores astrocíticos de alto grau de malignidade (III e IV), em relação aos tumores de baixo grau e meduloblastomas ( $P=0,001$ ,  $P=0,006$ , respectivamente). Diferenças na expressão *TIMP-1* foram observadas apenas entre astrocitomas de alto grau e meduloblastomas ( $P<0,0001$ ). Astrocitomas de baixo grau apresentaram maior expressão dos genes *TIMP-2*, *TIMP-3*, *TIMP-4* e *CDH1* ( $P=0,001$ ,  $P<0,0001$ ;  $P=0,0006$  e  $P=0,0002$ ) frente aos demais tumores, sugerindo que essas moléculas possuam um efeito de contenção da invasão tumoral. *CDH1* foi preferencialmente expresso no tecido não neoplásico frente aos astrocitomas de grau I ( $P=0,047$ ). Análises de sobrevida demonstraram que hipereexpressão de *MMP-9* nos glioblastomas é relacionada à sobrevida menor ( $P=0,007$ ). Análises posteriores demonstraram que esse é um fator prognóstico independente ( $P=0,013$ ). **Conclusões:** A elevação da expressão das *MMPs*, redução de *TIMPs* e *CDH1* parecem ser determinantes para a agressividade dos tumores neuroepiteliais, o que faz dessas vias potenciais alvos terapêuticos para novas estratégias no combate a essas neoplasias.

## ABSTRACT

### EXPRESSION PROFILE OF MIGRATION AND ADHESION GENES AMONG NEUROEPITHELIAL TUMORS OF CHILDREN AND ADULTS

The matrix metalloproteinase, their tecidual inhibitor and cadherins play an important role in evolution and progression of brain tumors. Different levels of gene expression of migration and adhesion genes has been reported between brain tumors types and their pathological grades suggesting that genes may be crucial for brain tumors development for this reason we decided evaluate the expression of genes from these genetics pathways in neuroepithelial tumors.

**Methods:** We analyzed 81 microdissected tumor samples obtained from gross total surgical resection: 62 astrocytomas, including 21 grade I, 10 grade II, 10 grade III, 21 glioblastomas, 19 medulloblastomas from patients admitted for treatment into HCFMRP-USP, and five non-neoplastic with matter brain tissue .The expression mRNA of *MMP2*, *MMP3*, *MMP-9*, *MT1-MMP*; *TIMP-1*, -2, -3.-4 and *CDH1* were quantified using real-time PCR, with TaqMan® probes. Kruskal-Wallis and Kaplan-Meir tests were performed for statistical analysis ( $P < 0.05$ )

**Results:** No differences on expression level of *MMP-2* and *MMP-3* were observed between analyzed tumors. High grade astrocytomas presents higher expression of *MMP-9* and *MT1-MMP* than low grade astrocytomas and medulloblastomas ( $P=0.001$ ) and ( $P=0.006$ ), respectively. Differences in expression of *TIMP-1* were observed only between high grade astrocytomas and medulloblastoma ( $P > 0.0001$ ). Low grade astrocytomas presents higher expression level of *TIMP-2*, *TIMP-3*, *TIMP-4* and *CDH1* than high grade astrocytomas and medulloblastomas ( $P=0.001$ ;  $P < 0.0001$ ;  $P=0.0006$  and  $P=0.0002$ ), respectively. *CDH1* gene was preferentially expressed in non-neoplastic white matter brain tissue than grade I astrocytomas ( $P=0.047$ ). Survival curves analysis showed that higher expression of *MMP-9* in glioblastomas is related to poor survival ( $P=0.007$ ) and analysis showed that this data is an independent prognostic factor ( $P=0.013$ ).

**Conclusions:** Our results suggests that the pathway the role of MMPs, TIMPs and adhesion molecules may be important for invasive and aggressive behavior of neuroepithelial brain tumors and could reveal an important therapeutic target for new strategies in oncology.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADAMs:** Metaloproteinases desintegrinas

**ADAMs-TS:** Metaloproteinases desintegrinas com domínio trobospondina

**cdNA:** Ácido Desoxirribonucléico Complementar

**CONEP:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

**HCFMRP-USP:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão preto da

Universidade de São Paulo

**MEC:** Matriz extracelular

**MMP:** Metaloproteinase de Matriz

**mRNA:** Ácido Ribonucléico Mensageiro

**MT-MMP:** Metaloproteinase de Matriz de Membrana

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PCR:** reação em cadeia da polimerase

**Pró-MMP:** Forma Inativa da Metaloproteinase de Matriz

**RQ-PCR:** reação em cadeia da polimerase em tempo real

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TIMP:** Inibidor Tecidual de Matriz Metaloproteinase

**TU:**Tumor

**GPI:** Glicosilfosfatidilinositol

**EGF:** fator de Crescimento Epidérmico

**VEGF:** fator de Crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Vias genéticas envolvidas no desenvolvimento dos glioblastomas primário e secundários.....	9
<b>Figura 2.</b> Estrutura geral das MMPs e de suas subfamílias.....	13
<b>Figura 3.</b> Tipos e estrutura dos promotores dos genes das metaloproteinases.....	17
<b>Figura4.</b> Representação esquemática da ativação e inibição das MMPs pelas TIMPs...	21
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática das interações moleculares entre E-Caderina e Catetinas na manutenção da integridade das junções célula-célula.....	25
<b>Figura 6 A:</b> Curva-padrão de diluições seriadas do gene <i>TIMP-3</i> fornecidas pelo Aparelho 7500 <i>Real-Time PCR System</i> ®.....	38
<b>Figura 6 B:</b> Curva-calibração do gene <i>TIMP-3</i> fornecida pelo Aparelho 7500 <i>Real-Time PCR System</i> ®.....	38
<b>Figura 7.</b> Apresentação dos níveis de expressão dos genes estudados e suas medianas de expressão nos grupos de tumores estudados (Teste Mann-Whitney).....	46
<b>Figura 8. (A)</b> Comparações estatísticas da expressão de <i>MMP-2</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). <b>(B)</b> Comparação estatística da expressão de <i>MMP-2</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	48
<b>Figura 9.</b> Perfil da expressão do gene <i>MMP-2</i> nas amostras estudadas.....	49
<b>Figura 10. (A)</b> Comparações estatísticas da expressão de <i>MMP-3</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). <b>(B)</b> Comparação estatística da expressão de <i>MMP-3</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	50
<b>Figura 11.</b> Perfil da expressão do gene <i>MMP-3</i> nas amostras estudadas.....	51
<b>Figura 12. (A)</b> Comparações estatísticas da expressão de <i>MMP-9</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). <b>(B)</b> Comparação estatística da expressão de <i>MMP-9</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	52
<b>Figura 13.</b> Perfil de expressão do gene <i>MMP-9</i> nas amostras estudadas.....	53

<b>Figura 14.</b> (A) Comparações estatísticas da expressão de <i>MT1-MMP</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de <i>MT1-MMP</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	54
<b>Figura 15.</b> Perfil de expressão do gene <i>MT1-MMP</i> nas amostras estudadas.....	55
<b>Figura 16.</b> (A) Comparações estatísticas da expressão de <i>TIMP-1</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de <i>TIMP-1</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	56
<b>Figura 17.</b> Perfil de expressão do gene <i>TIMP-1</i> nas amostras estudadas.....	57
<b>Figura 18.</b> (A) Comparações estatísticas da expressão de <i>TIMP-2</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de <i>TIMP-2</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	58
<b>Figura 19.</b> Perfil de expressão do gene <i>TIMP-2</i> nas amostras estudadas.....	59
<b>Figura 20.</b> (A) Comparações estatísticas da expressão de <i>TIMP-3</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de <i>TIMP-3</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	60
<b>Figura 21.</b> Perfil de expressão do gene <i>TIMP-3</i> em todas as amostras estudadas.....	61
<b>Figura 22.</b> (A) Comparações estatísticas da expressão de <i>TIMP-4</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de <i>TIMP-4</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).....	62
<b>Figura 23.</b> Perfil de expressão do gene <i>TIMP-4</i> em todas as amostras estudadas.....	63
<b>Figura 24A-B.</b> (A) Comparações estatísticas da expressão de <i>CDHI</i> entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de <i>CDHI</i> entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis)....	64
<b>Figura 25.</b> Comparação estatística entre tecido não neoplásico <i>versus</i> astrocitomas pilocíticos (Grau I).....	65
<b>Figura 26.</b> Perfil de expressão do gene <i>CDHI</i> em todas as amostras estudadas.....	66

<b>Figura 27.</b> Apresentação dos níveis de expressão do gene <i>MMP-9</i> e suas medianas de expressão nos grupos de astrocitomas pilocíticos de diferentes localizações (Teste não paramétrico Mann-Whitney).....	68
<b>Figura 28 A-I.</b> Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de <i>P</i> (teste log-rank) de pacientes acometidos por astrocitomas de alto grau para os genes de migração e adesão celular estudados.....	71
<b>Figura 29 A-I:</b> Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de <i>P</i> (teste log-rank) de pacientes acometidos por glioblastomas para os genes de migração e adesão celular estudados.....	73
<b>Figura 30 A-I.</b> Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de <i>P</i> (teste log-rank) de pacientes acometidos por meduloblastoma para os genes de migração e adesão celular estudados.....	74
<b>Figura 31.</b> (A) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de MMPs nos Astrocitomas de Alto grau (graus III e IV). (B) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de TIMPs nos Astrocitomas de Alto grau (graus III e IV).....	76
<b>Figura 32.</b> (A) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de MMPs nos Glioblastomas. (B) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de TIMPs nos Glioblastomas.....	77
<b>Figura 33.</b> (A) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de MMPs nos Meduloblastomas. (B) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de TIMPs nos Meduloblastomas.....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fatores estudados relacionados com o risco de tumores do SNC.....	4
<b>Tabela 2.</b> Classificação OMS dos tumores de SNC derivados do tecido neuroepitelial.	6
<b>Tabela 3.</b> Características moleculares e biológicas das TIMPs.....	20
<b>Tabela 4:</b> Registros, distribuição por gênero, cor, idade ao diagnóstico, histologia e localização anatômica do grupo de pacientes avaliados no estudo.....	32
<b>Tabela 5:</b> distribuição dos casos pediátricos e adultos de neoplasias de SNC .....	35
<b>Tabela 6:</b> Equações finais, com valores de <i>slope</i> e <i>intercept</i> , utilizadas para análise dos dados de RQ-PCR. [valor final (y) = $-slope \times \text{valor Ct} + intercept$ ] e eficiência dos <i>primers</i> .....	40
<b>Tabela 7:</b> Mediana, percentils ( <i>P</i> <sub>25-75</sub> ) e nível de significância dos valores de expressão dos genes de migração e adesão celular em tumores neuroepiteliais nas diferentes linhagens celulares (teste não paramétrico Mann-Whitney).....	44
<b>Tabela 8:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>MMP-2</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	48
<b>Tabela 9:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>MMP-3</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	50
<b>Tabela 10:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>MMP-9</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	52
<b>Tabela 11:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>MMP-14</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	54
<b>Tabela 12:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>TIMP-1</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	56
<b>Tabela 13:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>TIMP-2</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	58
<b>Tabela 14:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>TIMP-3</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	60

<b>Tabela 15:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>TIMP-4</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	62
<b>Tabela 16:</b> Comparação estatística da expressão do gene <i>CDHI</i> entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).....	64
<b>Tabela 17:</b> Valores da mediana, percentis 25-75 e nível de significância para os genes de migração e adesão celular estudados quanto ao local de origem do tumor (teste não paramétrico Mann-Whitney).....	68

..



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC).....	2
1.1.2 Tumores Astrocíticos.....	7
1.1.3 Tumores Embrionários.....	10
1.2 A matriz extracelular.....	11
1.2.1 Metaloproteinasas de Matriz.....	12
1.2.1.1Regulação transcricional dos genes das MMPs.....	16
1.2.1.2 Ativação das pró-enzimas.....	18
1.3 Inibidores teciduais das metaloproteinasas(TIMPs).....	19
1.4 E-caderina.....	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Casuística.....	31
3.2.Métodos.....	36
3.2.1 Microdissecção.....	36
3.2.2 Extração do RNA.....	36
3.2.3 Síntese do DNA complementar.....	37
3.2.4 Curvas de Calibração.....	37
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.1- Padrões de Expressão dos Genes de Migração e Adesão Celular nos Tumores Neuroepiteliais.....	43
4.1.1- Quanto à Linhagem Celular dos Tumores.....	43
4.2.- Quanto ao diagnóstico histopatológico dos tumores.....	47
4.2.1- <i>MMP-2</i> (Gelatinase A).....	47
4.2.2- <i>MMP-3</i> (Estromalisina 1).....	49
4.2. 3- <i>MMP-9</i> (Gelatinase B).....	51

4. 2.4- <i>MT1-MMP (MMP-14)</i> .....	53
4. 2.5- <i>TIMP-1</i> .....	55
4.2.6- <i>TIMP-2</i> .....	57
4. 2.7- <i>TIMP-3</i> .....	59
4.2.8- <i>TIMP-4</i> .....	61
4.2.9- <i>CDH1</i> .....	63
4.3- Quanto ao Local Primário de Origem Tumoral.....	67
4.4- Quanto à sobrevida global.....	69
<b>5-DISCUSSÃO</b> .....	78
5.1 Gelatinases A ( <i>MMP-2</i> ) e Gelatinases B ( <i>MMP-9</i> ).....	81
5.2 <i>Estromalisina-1 (MMP-3)</i> .....	83
5.3 <i>MMP-14 (MT1-MMP)</i> .....	87
5.4. <i>TIMP-1</i> .....	90
5.5 <i>TIMP-2</i> .....	92
5.6 <i>TIMP-3</i> .....	94
5.7 <i>TIMP-4</i> .....	96
5.8 <i>E-caderina (CDH1)</i> .....	99
<b>6-CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>7- REFERÊNCIAS</b> .....	105

## ANEXOS

### ANEXO DE PUBLICAÇÃO

# **1-INTRODUÇÃO**



## 1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central

As neoplasias do sistema nervoso central (SNC) constituem um grupo de tumores bastante heterogêneo em relação a uma série de características, como: epidemiologia, comportamento biológico, alterações genéticas observadas, tipo histológico, localização tumoral, padrão de disseminação, quadro clínico, história natural, idade de ocorrência e prognóstico (STROHER *et al.*, 2000; BEHIN *et al.*, 2003; LOUIS, 2006).

A sociedade americana de estudos do câncer (*American Cancer Society*) estimou que, 20500 pacientes foram diagnosticados com algum tipo de neoplasia do sistema nervoso no ano de 2007 (SEER, 2008). São diagnosticados cerca de 7 a 16 casos por 100.000 pessoas/ano de tumores primários do SNC em adultos, segundo relatos de Wrensch *et al.* 2002 e Binder *et al.*, 2003, onde cerca de 50% desses casos são de tumores metastáticos (HILL *et al.* 1999).

Os tumores do SNC são a terceira causa de morte por câncer em adultos de meia idade e a segunda causa mais comum de morte em crianças, sendo esse o tumor sólido mais freqüente na infância (GILES; GONZALES, 1995; HEUER *et al.*, 2007). A estimativa da incidência dessa neoplasia em crianças e adolescentes são de aproximadamente 2,7 casos por 100.000 pacientes/ano, correspondendo a 16% de todas as neoplasias que acometem pacientes dentro deste grupo; ocupando, assim, a segunda posição no *ranking* das neoplasias mais freqüentes na faixa etária de 0 a 20 anos, perdendo apenas para a leucemia. A taxa de mortalidade observada nos tumores do SNC é uma das maiores entre as neoplasias infantis, entretanto, com as melhorias nas condições diagnósticas e de tratamento, tem-se observado um aumento na taxa de sobrevida global nestes pacientes (POTTER *et al.*, 1998).

Estudos epidemiológicos apontaram um discreto aumento na incidência de tumores do SNC, durante as décadas de 80 e 90 em idosos e crianças (SWENSEN; BUSHOUSE, 1998;

---

FISHER *et al.*, 2007). O aumento aparente no número de casos dessas neoplasias está diretamente ligado à implementação de ferramentas de neuroimagem de alta resolução, como ressonância nuclear magnética e a tomografia computadorizada, causando impacto no diagnóstico clínico das doenças neurológicas (CRISTENSEN *et al.*, 2003; FISHER *et al.*, 2007). Além disso, outra causa importante para o aumento aparente da incidência de neoplasias do SNC foi a inclusão de neoplasias de baixo grau, antes não computadas nos registros de base populacional (LINET *et al.*, 1999).

As neoplasias do SNC apresentam diferentes taxas de incidência entre as populações, as mais elevadas são as dos países desenvolvidos. O atendimento médico mais acessível e as tecnologias de ponta aplicadas à saúde são alguns dos fatores que influenciam a elevação na incidência nos países desenvolvidos, entretanto, não são descartadas influências culturais, étnicas ou diferenças geográficas nos fatores de risco (OHGAKI; KLEIHUES, 2005; DAVIS, 2007). A incidência de neoplasias cerebrais observadas no Japão, por exemplo, representa menos da metade das relatadas nos países ao norte da Europa. Nos EUA, as neoplasias neuroepiteliais são mais frequentemente observadas em caucasianos do que em negros, hispânicos e asiáticos (WRENSCH *et al.*, 2002; SEER, 2008).

Os fatores etiológicos dos tumores do SNC não estão bem determinados e uma série de estudos tem procurado elucidar os fatores de risco para essas neoplasias, sendo alguns dos possíveis fatores estudados apresentados na Tabela 1. Apesar de todas as associações estudadas, as únicas que provaram ser causa de tumores primários do SNC foram as síndromes hereditárias (esclerose tuberosa, neurofibromatose tipos 1 e 2 ) e as radiações ionizantes utilizadas para fins terapêuticos (GUNEY; KADAN-LOTTICK, 2001; SKALR, 2002; DAVIS, 2007).

**Tabela 1.** Fatores estudados relacionados com o risco de tumores do SNC

---

Síndromes Hereditárias**
História Familiar de Tumores Cerebrais
Polimorfismos constitutivos
Sensibilidade de Linfócitos a Mutagênicos
Tumores anteriores
Infecções ou resposta imunológica
Alergias
Traumatismos crânicos
Epilepsia / convulsões
Drogas / Medicamentos
Dieta / Vitaminas
Tabagismo
Alcoolismo
Exposição a Tinturas de Cabelo
Poluição
Ocupação profissional
Radiações ionizantes**
Telefones Celulares
Exposição a outras frequências de Rádio

---

Adaptado de WRENSH *et al.*, 2002

\*\* Fatores etiológicos comprovados

A complexidade das classificações anatômico-patológicas e clínica dos tumores cerebrais é controversa, principalmente no que diz respeito aos tumores mistos. Em função disso, a classificação histológica das neoplasias do SNC é alvo de constantes revisões, desde a primeira tentativa de classificação histológica proposta por Bailey & Cushing até os dias atuais (WRENSH *et al.*, 2002, LOUIS *et al.*, 2007 ).

---

A classificação histológica das neoplasias do SNC adotada atualmente é a proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a qual divide essas entidades de acordo com o tipo celular predominante nas lesões. Essa classificação expande o conceito de grau de malignidade, incorporando os dados fenotípicos e de alterações moleculares observadas nessas neoplasias. A classificação da OMS organiza as neoplasias cerebrais em tumores neuroepiteliais, de nervos periféricos, das meninges, linfomas e neoplasias hematológicas, de células germinativas, tumores de região selar e tumores metastáticos, somando mais de 100 entidades histológicas distintas (KLEIHUES *et al.*, 2002; LOUIS *et al.*, 2007).

Os tumores do SNC originados do tecido neuroepitelial são os mais freqüentemente observados em crianças e adultos. Seus subtipos apresentam comportamento biológico distinto, sendo diferenciados por características histológicas como: atipia nuclear, índice mitótico, formação de microvasos sanguíneos e necrose. Tais peculiaridades são utilizadas, também, para avaliação do grau de malignidade adotado pela OMS (KLEIHUES *et al.*, 2002; LOUIS, 2006). A Tabela 2 apresenta de forma simplificada a classificação da OMS para os tumores neuroepiteliais. Este estudo deteve-se aos tumores neuroepiteliais derivados dos astrócitos (astrocitomas) e aos tumores embrionários (meduloblastomas).

**Tabela 2.** Classificação OMS dos tumores de SNC derivados do tecido neuroepitelial

<b>TUMORES NEUROEPITELIAIS</b>	
<b>Astrocíticos</b>	
Astrocitoma Pilocítico- Grau I	9421/1*
Astrocitoma Difuso- Grau II	9420/3
Astrocitoma Anaplásico- Grau III	9401/3
Glioblastoma – Grau IV	9440/3
Gliomatosis cerebri	9381/3
<b>Oligodendroglias</b>	
Oligodendroglioma- Grau II	9450/3
Oligodendroglioma Anaplásico- Grau III	9382/3
<b>Ependimários</b>	
Ependimoma- Grau II	9391/3
Ependimoma anaplásico- Grau III	9392/3
Ependimoma mixopapilar	9394/1
Subependimoma	9383/1
<b>Tumores do plexo coróide</b>	
Papiloma do plexo coróide	9390/0
Papiloma do plexo coróide atípico	9390/1
Carcinoma do plexo coróide	9390/3
<b>Gliomas mistos e de origem incerta</b>	
Astroblastoma	9430/3
Glioma Angiocêntrico	9431/1
Gliomas Coróide do 3º ventrículo	9444/1
<b>Tumores mistos de origem glial e neuronal</b>	
Ganglioglioma (anaplásico)	9505/1
Ganglioglioma	9505/1
Neurocitoma	9506/1
<b>Embrionários</b>	
Meduloblastoma	9470/3
Meduloepitelioma	9501/3
Tumor teratóide-rabdóide	9508/3

\* Código Internacional de Doenças - Oncologia -- CID-O (Adaptado de LOUIS *et al.*, 2007)



### 1.1.1 Tumores Astrocíticos

Os tumores astrocíticos são derivados das principais células de sustentação da glia, os astrócitos. Essas neoplasias são os tumores cerebrais primários mais frequentes, apresentam-se bastantes heterogêneas, diferindo quanto à localização, idade, extensão, potencial invasivo, curso clínico e tendência à progressão (KHATUA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003). Classicamente, os astrocitomas são divididos de acordo com o grau de malignidade em: astrocitomas pilocíticos (grau I), astrocitomas difusos ou fibrilares (grau II), astrocitomas anaplásicos (grau III) e glioblastomas multiformes (grau IV).

Os astrocitomas pilocíticos são neoplasias de ocorrência rara, com incidência estimada em menos de 1 caso/100.000 pessoas/ano. Preferencialmente são casos pediátricos, geralmente localizadas nos hemisférios cerebrais, apresentando lesões circunscritas e não infiltrativas, de crescimento lento e raramente levadas à transformação maligna. Dessa forma, esses tumores juntamente com os astrocitomas difusos são considerados como neoplasias de baixo grau de malignidade (EVREN-KELES *et al.*, 2004). Apesar dessas neoplasias apresentarem um comportamento benigno quando localizadas nos hemisférios cerebrais, o mesmo não é observado quando as lesões ocorrem nas vias ópticas e no hipotálamo.

Histologicamente, os astrocitomas pilocíticos se apresentam como neoplasias de celularidade baixa a moderada, constituídas por astrócitos de aspecto regular, com núcleos uniformes e com poucas atipias, chama a atenção a presença de numerosas fibras de Rosenthal, que são inclusões protéicas no interior de prolongamentos astrocitários (STROTHER *et al.*, 2000). A cirurgia é o tratamento de escolha para tais lesões, sendo curativa na maioria dos casos. A quimioterapia tem sido utilizada em casos específicos, especialmente em crianças com tumores de vias ópticas e que progridem após um período inicial de observação, com deterioração potencial da visão (PACKER *et al.*, 1997).

---

Os astrocitomas difusos ou fibrilares (grau II) são menos freqüentes em crianças, afetando mais comumente adultos jovens. Ao exame histopatológico, estes tumores apresentam maior celularidade, geralmente não apresentam os microcistos e fibras de Rosenthal; são mais infiltrativos e tendem a sofrer transformação anaplásica de modo mais freqüente (BEHIN *et al.*, 2003).

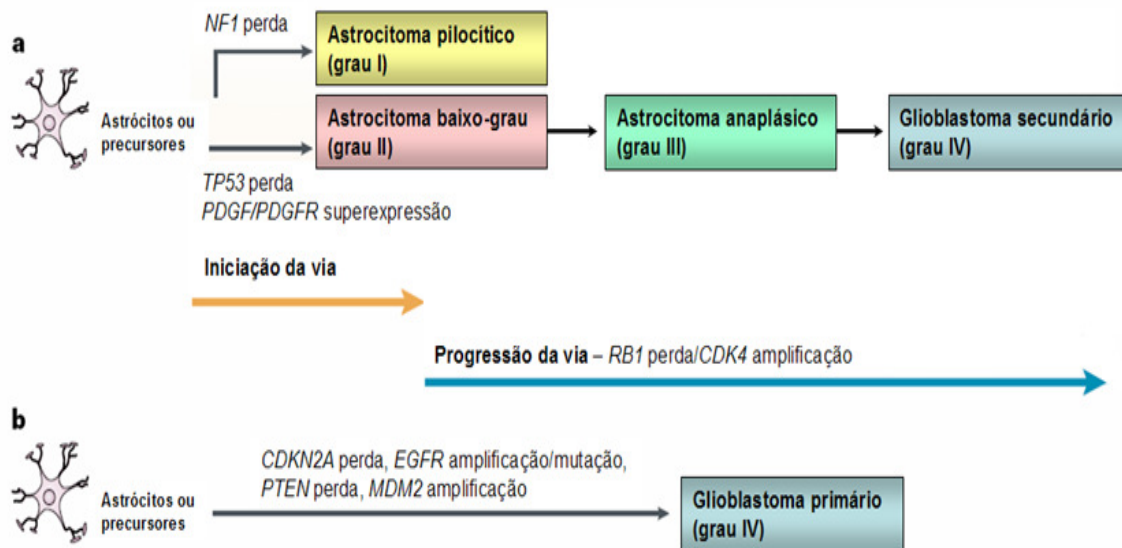
Astrocitomas anaplásicos (grau III) são neoplasias infiltrativas, com um alto potencial proliferativo, afetando principalmente adultos. Esses tumores apresentam uma menor sobrevida quando comparados com os dois anteriores, chegando a uma média de 3 a 4 anos em 70% dos casos. A cirurgia continua sendo a melhor opção de tratamento e esta deve ser a mais ampla possível (BEHIN *et al.*, 2003).

O astrocitoma grau IV, mais comumente, chamado de glioblastoma multiforme é o tipo de tumor cerebral mais freqüente em adultos e o tumor mais agressivo desta linhagem, correspondendo a aproximadamente 50 % dos tumores malignos do SNC. São clinicamente agressivos e extremamente invasivos, com capacidade de invasão extra-axial. Essa neoplasia se apresenta freqüentemente na idade adulta, após os 40 anos de idade, mas não são exclusivos desta idade (BINDER *et al.*, 2003).

As características histológicas dessa neoplasia são: hiper celularidade, atipia e anaplasia celular e nuclear, freqüentes figuras de mitose, necrose e proliferação endotelial. (STROTHER *et al.*, 2000; BEHIN *et al.*, 2003).

O tratamento é o cirúrgico, no entanto pacientes com muitos problemas neurológicos, muito idosos (acima de 80 anos), ou que possuem riscos elevados para anestesia, devem ser avaliados cuidadosamente e, em muitos casos, somente uma biópsia é o mais indicado. A radioterapia local também está indicada, mesmo nos casos onde não existe indicação cirúrgica.

Os glioblastomas podem se originar a partir da transformação de um tumor de baixo grau ou anaplásico, sendo chamado de glioblastoma secundário ou pode ser diagnosticado primariamente, sendo chamado glioblastoma primário (KLEIHUES *et al.*, 2000). Essa divisão não tem repercussão prática com relação ao tratamento. Embora essa classificação seja amplamente aceita na prática clínica, a designação primário ou secundário dos glioblastomas é mais conceitual do que propriamente um termo diagnóstico. O estudo molecular dessas neoplasias permitiu uma classificação baseada em alterações genéticas, apresentadas na Figura 1, encontradas comumente nesses tumores que podem distinguir os glioblastomas primários dos secundários (ZHOU; PARADA, 2002).



**Figura 1.** Vias genéticas envolvidas no desenvolvimento dos glioblastomas primários e secundários (Adaptado de ZHOU; PARADA, 2002).

### 1.1.2 Tumores Embrionários

O meduloblastoma (MB) é definido como um tumor maligno de origem cerebelar, que surge predominantemente na área do *vermis* do cerebelo, localizado na fossa posterior, com forte tendência a metástases. É considerado o segundo tumor cerebral pediátrico mais freqüente, atrás apenas dos astrocitomas, correspondendo a 20- 25% dos tumores que afetam as crianças e a 40% dos tumores localizados na fossa posterior (STROTHER *et al.*, 2000; GILBERTSON, 2004; POLKINGHORN; TARBELL, 2007).

O pico de incidência dessa neoplasia embrionária é observado aos cinco anos, sendo que a maioria dos casos ocorre dentro da primeira década de vida, observando um ligeiro predomínio em indivíduos do sexo masculino, na proporção de M:F de 2:1 (PACKER, 1999). Dentre todos os tumores do SNC, é o que mais freqüentemente pode originar metástases extracranianas, com predileção para ossos, medula óssea, linfonodos, fígado e pulmão (STROTHER *et al.*, 2000). Histologicamente, o meduloblastoma é formado por pequenas células de núcleos hipercromáticos redondos ou ovais de citoplasma escasso com atividade mitótica variável (KLEIHUES *et al.*, 2000; GILBERTSON, 2004).

O tratamento dessa neoplasia é predominantemente cirúrgico, visando à ressecção total da lesão, seguido de quimioterapia e radioterapia, visto que os MBs são quimiosensíveis aos derivados da platina e agentes alquilantes (PACKER, 1999).

Algumas alterações genéticas têm sido freqüentemente relatadas nos MBs, dentre essas merecem especial atenção a formação do isocromossomo 17q [i(17q)], resultando da perda de heterozigosidade do braço curto do cromossomo 17 (ALDOSARI *et al.*, 2002), e alterações moleculares relacionadas ao prognóstico desfavorável, como a hiperexpressão dos genes *TRKC*, *C-ERBB-2* e *MYCC* (CHOPRA *et al.*, 2003), bem como a deleção da região 16q22.1, onde está localizado o gene *CDH1* que codifica a molécula de adesão E-caderina (RUSSO *et al.*, 1999).

As principais vias genéticas descritas na literatura envolvidas no desenvolvimento de neoplasias do SNC compreendem genes do controle do ciclo celular (KATHUA *et al.*, 2003), apoptose (PINGOUDMEIER *et al.*, 2003), angiogênese (FULLER *et al.*, 1999); resistência a drogas antineoplásicas (BEGER *et al.*, 2001) e genes responsáveis pela adesão e migração celular, os quais estão diretamente envolvidos na degradação da matriz extracelular (MEC) (MUNAUT *et al.*, 2003).

## 1.2 A matriz extracelular

A MEC é constituída por uma rede complexa de proteínas e proteoglicanos, secretadas pelo tecido conjuntivo, com o objetivo de dar suporte aos tecidos que compõem um organismo. Essa rede de proteínas exerce uma influência determinante em diversas atividades biológicas (MATRISIAN, 1990; GIANCOTTI *et al.*, 1999).

A degradação da MEC é um processo fisiológico elegante, estritamente controlado por equilíbrio dinâmico entre as vias das metaloproteinases de matriz (MMPs) e dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). As interações célula-MEC enviam sinais citoquímicos capazes de promover a diferenciação celular, migração e mobilidade necessárias para homeostase celular (CHANG; WERB, 2001). As MMPs degradam as proteínas da MEC e de seu microambiente pericelular, ativando, assim, fatores de crescimento e as moléculas de adesão. Esses eventos são fundamentais para uma variedade de processos fisiológicos, tais como: desenvolvimento embrionário, remodelação, reparação tecidual e angiogênese (MATRISIAN, 1990; CHAKRABORTI *et al.*, 2003).

A destruição desordenada da MEC desempenha um papel crucial no desenvolvimento de diversas patologias, como: fibrose hepática, aneurisma, periodontoses, artrite reumatóide, esclerose múltipla, fibrose cística e formação de tumores. O desenvolvimento das neoplasias é

um processo altamente dependente do seu microambiente, sendo um fator determinante a essa condição a produção e/ou ativação desordenada de enzimas proteolíticas envolvidas na degradação e remodelação da MEC (OVERALL *et al.*, 2002; POLLET *et al.*, 2004).

### 1.2.1 Metaloproteínas de Matriz

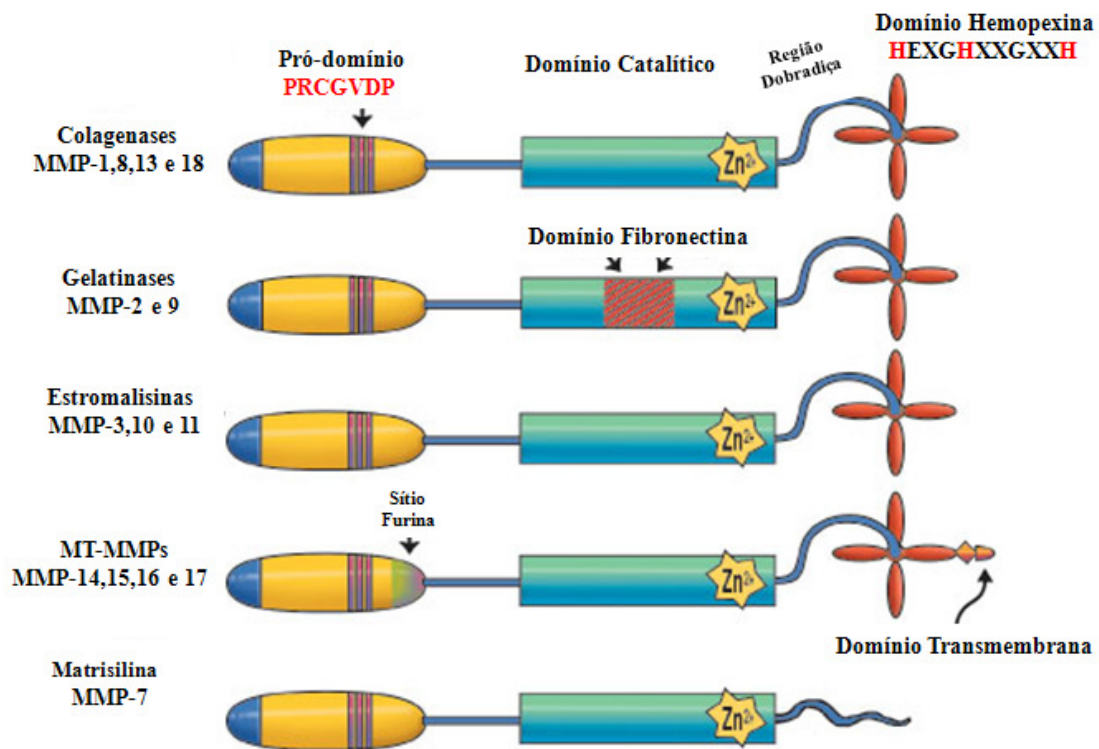
As proteínas metaloproteínas são divididas de acordo com suas características bioquímicas em: MMPs, metaloproteínas desintegrinas (ADAMs), proteínas que apresentam os domínios de metaloproteína e desintegrinas e as metaloproteínas desintegrinas com domínio de trobospondina (ADAMS-TS) (WERB, 1997; MALEMUD, 2006).

As MMPs são peptidases dependentes de zinco ( $Zn^{+2}$ ), altamente conservadas e que possuem especificidade de substrato, capazes de degradar proteoglicanos, laminina, fibronectina, gelatinas e o colágeno fibrilar (tipo I, II, III, V e XI) presentes na membrana basal, bem como na MEC (YONG *et al.*, 1998; CURRAN; MURRAY, 2000). São conhecidos mais de 20 membros dessa família de proteases. As MMPs de mamíferos são classificadas em solúveis (secretadas) e de membrana (MT-MMPs) (SEIKI, 1999; PEI *et al.*, 2000, AMALINEI *et al.*, 2007).

As MMPs solúveis são sintetizadas como pró-enzimas, enquanto que as MT-MMPs são ativadas no espaço intracelular e expressas na superfície celular como enzimas ativas. As MMPs solúveis são divididas em quatro subclasses, de acordo com as suas características estruturais e funcionais, em: colagenases, gelatinases, estromalisinas e matrisilinas (NAGASE; WOESSNER, 1999; NABESHIMA *et al.*, 2002; VISSE; NAGASE, 2003) (Figura 2).

A estrutura geral das MMPs é composta por três domínios conservados entre os membros dessa família, porém distintos entre si, que exercem diferentes funções nessas moléculas: um pró-domínio N-terminal, um domínio catalítico e um domínio C-terminal que contém o motivo conservado Hemopexina (HEXGHXXGXXH). As subfamílias das matrisilinas não possuem este

último domínio. Os resíduos de histidina (H) contidos no domínio hemopexina estão envolvidos na ligação ao  $Zn^{+2}$ , necessária para atividade proteolítica. No pró-domínio das MMPs também é encontrado um motivo altamente conservado PRCGVDP, que forma uma união covalente com o domínio  $Zn^{+2}$ , mantendo a proteína na sua forma não ativada, zimogênio. As gelatinases apresentam um sítio de ligação de fibronectina, no domínio catalítico, que confere especificidade ao substrato (Figura 2) (NAKADA *et al.*, 1999; STAMENKOVIC, 2003; POLLET *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Estrutura geral das MMPs e de suas subfamílias (Adaptado de STAMENKOVIC, 2003).

À subfamília das collagenases pertencem as enzimas MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18, as quais apresentam características bioquímicas que permitem a clivagem do colágeno intersticial I, II e III, em um sítio específico do domínio N-terminal. O colágeno intersticial I é uma das substâncias mais abundantes nos organismo humano, sendo assim, os membros dessa subfamília desempenham um papel determinante nos processos de remodelação/degradação da MEC (CURRAN; MURRAY, 2000; VISSE; NAGASE, 2003).

O grupo das gelatinases é composto pelas enzimas gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9). Essas enzimas são especializadas em degradar o colágeno tipo IV, principal constituinte da membrana basal dos vasos sanguíneos cerebrais. Como mencionado, essas enzimas possuem três repetições de domínio fibronectina, inserido em seus domínios catalíticos, que permitem que as gelatinases se liguem ainda às lamininas e gelatinas (YONG *et al.*, 1998).

A MMP-2, gelatinase de 72 kDa, codificada no cromossomo 16q13, é constitutivamente expressa em muitos tipos celulares. Essa enzima possui a capacidade de degradar colágenos V, VII, XI e a fibronectina. A MMP-2 também medeia a proliferação, adesão e migração celular. Essa enzima é secretada na forma inativa e sua atividade catalítica é estabelecida pela interação com o complexo formado pela metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP ou MMP-14) e TIMP-2 (CHINTALA *et al.*, 1999).

A protease MMP-9 é caracterizada como uma enzima de 90-110 kDa codificada na região 20q11.2-13.1. Essa enzima também é secretada como zimogênio, podendo ser armazenada na forma ativa ou latente no citosol. A expressão de MMP-9 não é constitutiva e pode ser influenciada por muitos fatores, tais como: de crescimento, citocinas, adesão célula-célula e célula-MEC. O mecanismo de ativação dessa protease envolve uma complexa rede de interação com outras MMPs e TIMPs (CHINTALA *et al.*, 1999; AMALINEI *et al.*, 2007).



---

O grupo das estromalisinas é composto pelas proteases MMP-3 (estromalisina-1), localizada na região 11q23, MMP-10 (estromalisina-2) e MMP-11(estromalisina-3), que apresentam substratos similares, no entanto, MMP-3 possui maior atividade proteolítica que as demais estromalisinas. A MMP-3 é expressa em diversos tipos celulares, e possui como substrato os seguintes componentes da MEC: colágeno, gelatina, elastina, fibronectina e vitronectina. Além de digerir componentes da MEC, a enzima MMP-3 participa da ativação de pró-MMP-1e pró-MMP-9 (EGEBLAD; WERB, 2002).

A subfamília da MMPs de membrana é constituída por seis MT-MMPs (MT1-MMP - MT6-MMP) e mais dois membros que são proteínas ancoradas do tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MMP-17 e MMP-25). Um dos membros de maior destaque dessa subfamília é a MT1-MMP (MMP-14), que tem como substrato os colágenos dos tipos I, II e III, gelatina, fibronectina e laminina (KOSHIKAWA *et al.*, 2000).

A MMP-14 (MT1-MMP) é considerada uma molécula multifuncional, envolvida diretamente no crescimento celular, inflamação, formação de novos vasos, bem como nos processos de adesão e migração celular e, conseqüentemente, na formação de metástases (YANA; SEIKI, 2002; SHIONI; OKADA, 2003).

As interações que MT1-MMP faz com a molécula de TIMP-2, desempenham um papel crucial na ativação da pró-MMP-2. O domínio catalítico de MT1-MMP liga-se a porção N-terminal de TIMP-2, fazendo com que a região C-terminal de TIMP-2 torne-se capaz de ligar ao domínio hemopexina de pró-MMP-2. A localização na membrana dessa protease confere uma vantagem à proteólise pericelular, uma vez que essa molécula ativa a pró-MMP-2, podendo assim, usar os substratos exógenos para mediar os processos de invasão e metástase. (STERNLICHT; WERB, 2001; SOUNNI *et al.*, 2003).

Os níveis de expressão das MMPs estão sob o controle de um mecanismo genético sofisticado. Em condições normais os níveis das MMPs são relativamente baixos, no entanto, há um aumento da expressão das MMPs decorrente dos processos de remodelação da MEC, resultante de processos fisiológicos ou patológicos. Em algumas subfamílias de MMPs, a expressão é tecido específico. A regulação da expressão das MMPs ocorre por três vias principais: I- regulação da transcrição das MMPs; II- ativação das pró-enzimas e III- Inibição pela ação das TIMPs, sendo estes últimos mecanismos pós-transducionais de regulação (YONG *et al.*, 1998; NAGASE *et al.*, 2006).

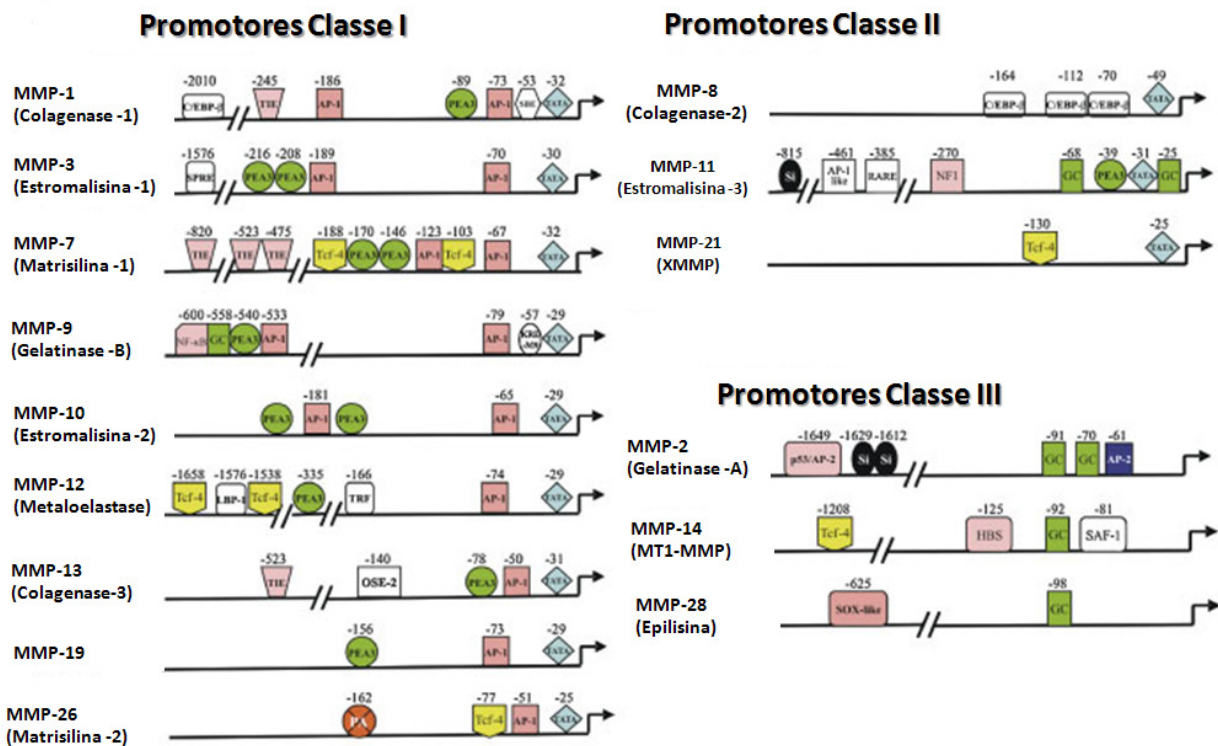
#### 1.2.1.1 Regulação transcricional dos genes das MMPs

Os genes das MMPs abrigam alguns elementos regulatórios que controlam sua expressão, dentre estes se destacam os sítios *API* (*Activating Protein-1*), *PEA3* (*Polyoma Enhancer Activator 3*), *SP1*,  $\beta$ -catenina/Tcf-4 e Nf-kB, que aparentemente possuem um efeito sinérgico na regulação dos genes das MMPs. Baseado na composição desses elementos regulatórios, os promotores desses genes podem ser divididos em três classes: classe I, II e III (YAN; BOLD, 2007).

Os promotores de classe I contêm um *TATA BOX* na posição -30 (relativo ao sítio de início da transcrição) e um sítio de ligação *API*, na posição -70. Muitos desses promotores ainda contêm um sítio de ligação à *PEA3*, vizinho à *API* que coopera com a regulação gênica das MMPs. Os promotores de classe II também possuem um *TATA BOX*, sem o sítio *API* proximal. A regulação desses promotores é relativamente mais simples e distinta da regulação dos promotores da classe I (BENBOW; BRINCKERHOFF, 1997; CHAKRABORTI *et al.*, 2003).

O terceiro e último grupo de promotores não possui o *TATA BOX* em sua estrutura, fazendo com que a transcrição se inicie em sítios múltiplos, entretanto, a regulação deste grupo é

controlada pela família dos fatores de transcrição *SPI*, que se ligam próximo ao *box CG*. As proteínas FOS e JUN participam ativamente do mecanismo de regulação da transcrição onde formam um heterodímero que se une aos sítios *API*, estimulando a produção das MMPs, em resposta ao aumento de mediadores inflamatórios no meio (MATRISIAN, 1990). As diferenças estruturais entre os promotes MMPs são mostradas na Figura 3.



**Figura 3.** Tipos e estrutura dos promotores dos genes das metaloproteinases (Adaptado de YAN; BOLD, 2007).

### 1.2.1.2 Ativação das pró-enzimas

As MMPs são sintetizadas como zimogênios, formas inativas das proteínas. Essas enzimas podem ser ativadas *in vivo* por proteinases ou *in vitro* por agentes químicos como: agentes tiol ( $\text{HgCl}_2$  e N-etilmaleimida), SDS, oxigênio reativo, além de aquecimento e exposição a PH ácido. A ativação *in vivo* ocorre no espaço extracelular e requer quebra do complexo zinco-cisteína e exposição do seu sítio catalítico. O resíduo cisteína (C) da seqüência **PRCGVPD**, presente no pró-domínio, interage com a porção  $\text{Zn}^{2+}$  do domínio catalítico mantendo as pró-MMPs na forma latente. A ruptura dessa interação de Cis-  $\text{Zn}^{2+}$  resulta em uma ativação parcial da forma intermediária da enzima, levando em seguida à autocatálise da região pró-peptídica, conferindo, assim, a atividade total da enzima. Esse mecanismo permite que as pró-MMPs sejam ativadas por múltiplos agentes (VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990; RA; PARKS, 2007).

O sistema plasminogênio/uroquinase é um importante ativador fisiológico de pró-MMPs. O fator ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) e o fator ativador do plasminogênio encontram-se associados à membrana, criando, assim, um sítio de ativação de pró-MMPs e subsequente renovação da MEC. A plasmina pode ativar pró-MMP-1, pró-MMP-3, pró-MMP-7, pró-MMP-9, pró-MMP-10 e pró-MMP-13 (NAGASE *et al.*, 2006).

A maioria das pró-MMPs secretadas é ativada no espaço extracelular. Algumas pró-MMPs apresentam um domínio furina (KCKR) que permite que sejam ativadas no espaço intracelular pela furina, dentre estas estão as pró-MMPs11, MT-MMPs-, pró-MMP-23 e pró-MMP-28 ( SATMENKOVIC, 2003; AMALINEI *et al.*, 2007).

A ativação de pró-MMP-2 é mediada pelas MT-MMP, com exceção de MT4-MMP, e conta ainda, com a participação de TIMP-2. A pró-MMP-2 forma um complexo com TIMP-2 através de seu domínio C-terminal, permitindo que o domínio N-terminal de TIMP-2 se ligue a

MT1-MMP na superfície da célula. O complexo MT1-MMP2-TIMP-2-pró-MMP-2 é então apresentado a MT1-MMPs adjacentes e livres desse complexo para ativação. O domínio hemopexina parece facilitar esse processo de ativação (JO *et al.*, 2000).

### 1.3 Inibidores teciduais das metaloproteinases

Os inibidores teciduais das metaloproteinases constituem o terceiro nível do processo de regulação da expressão das MMPs. Essas proteínas são os principais inibidores fisiológicos das MMPs. Os TIMPs são moléculas de baixo peso molecular, 21-30 kDa, que possuem cerca de 12 resíduos de cisteínas envolvidos na formação de seis pontes dissulfito responsáveis pela formação de dois domínios, essenciais para a interação dessas moléculas com as MMPs. O domínio C-terminal é responsável pela interação e ativação das pró-MMPs, bem como, pela localização dessas proteínas. Já o domínio N-terminal atua como unidade independente, que possui a atividade inibidora das MMPs (BREW *et al.*, 2000; BAKER *et al.*, 2002).

O bloqueio da atividade proteolítica das MMPs solúveis e de membrana, é realizado pelas TIMPs, através da formação de complexos monocovalentes na proporção de 1:1 entre sítio catalítico das MMPs e a porção N-terminal das TIMPs. Os grupos amino e carbonila do resíduo de cisteína presente na porção N-terminal das TIMPs agem em conjunto “quelando” o  $Zn^{2+}$  presente no domínio catalítico das MMPs, tornando-o indisponível para ativação das MMPs (VISSE: NAGASE, 2003; NAGASE *et al.*, 2006).

Quatro TIMPs foram caracterizadas em humanos, designadas como TIMP-1, -2, -3 e -4, resistentes à desnaturação por calor e à degradação proteolítica. Essas proteínas são expressas em uma variedade de tipos celulares e fluidos corporais (GÓMEZ *et al.*, 1997). Embora todas as TIMPs tenham capacidade de inibir todas as MMPs estudadas, elas diferem em muitos aspectos como: solubilidade, interação com pró-enzimas e regulação da expressão. As TIMPs -1, -2 e -4

estão presentes na forma solúvel, enquanto que a TIMP-3 é ligada à MEC (LAMBERT *et al.*; 2004). A expressão de TIMP-1 é induzida, essa molécula apresenta fraca ação inibidora frente à MMP-19 e as MT-MMPs (-1, -2, -3 e -5), inibindo ainda um membro da família das ADAMS, a ADAM-10. A expressão de TIMP-2 é constitutiva e sua ação inibidora frente as MT-MMPs é eficaz. TIMP-3 pode inibir ainda outros membros da família ADAM, como ADAM 17 e ADAMTS-4 e -5, sendo o efeito dessa molécula na inibição de MMP-9 maior que as observadas pelas TIMPs -1 e -2. A TIMP-4 apresenta expressão induzida e suas ações inibidoras frente às MMPs parece ser livre de restrições. A Tabela 3 apresenta algumas características moleculares e biológicas das TIMPs (WATSON; TIERNEY, 1998; DREW *et al.*, 2000).

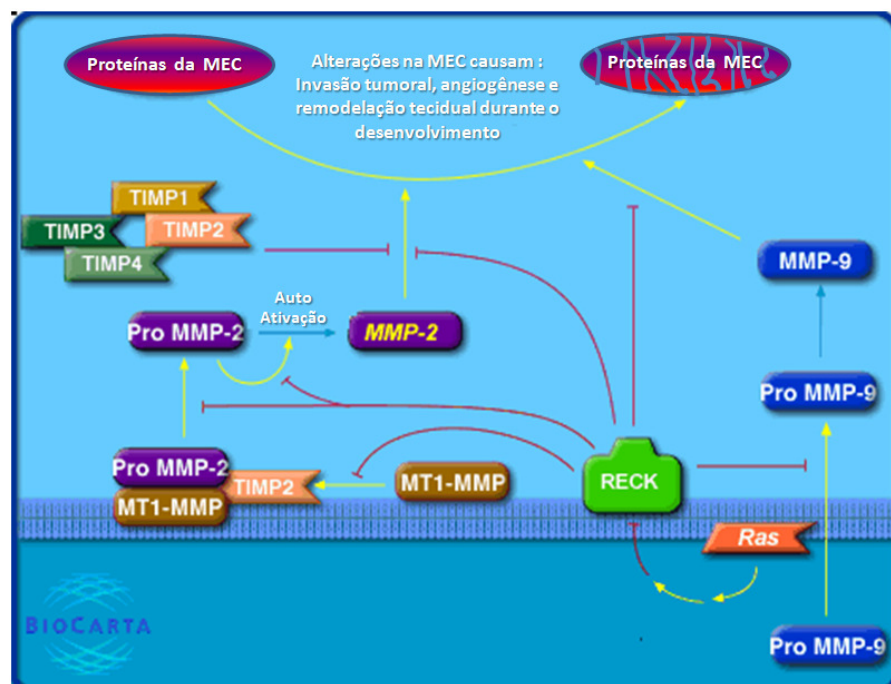
**Tabela 3.** Características moleculares e biológicas das TIMPs

	<i>TIMP-1</i>	<i>TIMP-2</i>	<i>TIMP-3</i>	<i>TIMP-4</i>
Localização cromossômica	Xp11.23-11.4	17q23-17q25	22q12.1-22q13.2	3p25
mRNA (Kb)	0,9	3,5	5,0	1,4
Massa Molecular (kDa)	28,5	21	22/27	22
Localização protéica	Solúvel	Solúvel	MEC	Solúvel
Associação pró-MMPs	pró-MMP9	pró-MMP2	pró-MMP2/9	pró-MMP2
Expressão Gênica	Induzida	Constitutiva	Induzida	Induzida
Efeitos Tumorigênicos	Inibição	Inibição	Inibição	Inibição
Metástases	Estimula	—	—	Estimula

(Adaptado de BAKER *et al.*, 2002).

As TIMPs apresentam, também, a habilidade de formar complexos com pró-MMPs, regulando, assim, seu processo de ativação. A TIMP-1 forma complexos preferencialmente com pró-MMP-9, enquanto que TIMP-2 se liga preferencialmente à pró-MMP-2 facilitando sua ativação (BAKER *et al.*, 2002). A TIMP-3 liga-se tanto à pró-MMP-2 quanto à pró-MMP-9 (BIGG *et al.*, 1997) e a TIMP-4 pode se ligar à porção C- terminal do domínio de pró-MMP-2 (BUTLER *et al.*, 1999).

A ação inibidora das MMPs não é exclusiva das TIMPs, outras moléculas também desempenham esse papel, dentre as quais destacam-se: moléculas de  $\alpha$ -macroglobulina, inibidor geral de proteases, os precursores  $\beta$ -amilóides ligados a membrana celular e, ainda, a proteína de membrana RECK, uma proteína ancorada a membrana do tipo GPI, que diminui a atividade catalítica de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, capaz ainda de suprir a atividade angiogênica nos processos neoplásicos, levando a morte das células tumorais (OH *et al.*, 2001). O esquema de interação entre ativação e inibição das MMPs pelas TIMPs é apresentado na Figura 4.



**Figura 4.** Representação esquemática da ativação e inibição das MMPs pelas TIMPs (Adaptado de [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)).

A principal função das TIMPs é a de inibidor natural das metaloproteinases, entretanto, alguns estudos apresentam outras funções atribuídas as TIMPs, algumas dessas relacionadas com a inibição das MMPs e outras independentes desse processo, como a promoção da proliferação celular, atividade anti-apoptose e anti-angiogênese (CHANG; WERB, 2001; CHIRCO *et al.*, 2006).

A atividade de indução da proliferação celular dessas moléculas foi descrita primeiramente envolvendo as TIMPs -1 e -2, potencializando o efeito da eritropoetina na proliferação e na diferenciação dos precursores eritróides. Essa propriedade não foi observada somente neste tipo celular, mas também em queratinócitos, condrócitos, células epiteliais e em células cancerosas (HAYAKAWA *et al.*, 1992; MURATE *et al.*, 1993).

Além da promoção da proliferação celular, as TIMPs podem também modular de várias maneiras a apoptose, inclusive com efeitos divergentes. As TIMPs -1 e -2 estão envolvidas na resistência à apoptose de células normais e cancerosas. O efeito da TIMP-3 é divergente uma vez que a proteína promove a apoptose em células do músculo liso, induzindo o desprendimento da matriz extracelular de células transformadas (BAKER *et al.*, 1998).

Os efeitos de TIMP-4 na modulação apoptótica são contraditórios; fibroblastos transformados do tecido cardíaco parecem ser induzidos à apoptose pela TIMP-4, enquanto que, em linhagens celulares de tumores de mama essa proteína parece ter um efeito inibidor da apoptose, quando hiperexpressa (BAKER *et al.*, 2002).

A angiogênese é descrita como o processo biológico, onde novos capilares são formados a partir de vasos já existentes, que ocorre em eventos normais e patológicos. As TIMPs apresentam atividade anti-angiogênica que foi demonstrada primeiramente por TIMP-1 e TIMP-2, que quando hiperexpressas reduzem atividade angiogênica em adenocarcinomas de pâncreas (BLOOMSTON *et al.*, 2002). A TIMP-3 também possui atividade anti-angiogênese e anti-invasão, reduzindo, por



exemplo, a capacidade de invasão da linhagem celular *HT1080* derivada de fibrossarcoma, bem como a expressão de MMP-9, molécula com reconhecida atividade promotora da angiogênese (LAMBERT *et al.*, 2004). Essas observações corroboram que o desequilíbrio entre as expressões de MMPs e TIMPs tem papel determinante na instalação e evolução dos processos neoplásicos.

Diversos estudos têm demonstrado a alteração nos níveis de expressão de MMPs em tumores do SNC correlacionado com o aumento da agressividade do tumor (KACHRA Z *et al.*, 1999; PAGENSTECHEER *et al.*, 2001; LEVICAR *et al.*, 2003).

As gelatinases, MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (geletinase B) têm sido identificadas como fatores importantes no desenvolvimento de gliomas de alto grau. Estudos *in vitro* demonstraram uma expressão elevada de MMP-2 em células de gliomas que parece estar relacionada com o comportamento invasivo dessas células (UHM *et al.*, 1996; DERYGINA *et al.*, 1997). A expressão da MMP-9 pode ser induzida por vários agentes, ou ainda pela seqüência de eventos que levam a transformação das células de gliomas (ESTEVE *et al.*, 1998).

Ensaio *in vivo* também demonstram que a hiper-expressão dessas duas enzimas (MMP-2 e MMP-9) estão relacionadas com o grau de malignidade dos gliomas, e a redução seletiva da expressão de *MMP-9* pode reduzir a capacidade invasiva de células de glioblastomas (FORSYTH *et al.*, 1999; KONDRAGANTI *et al.*, 2000), além da expressão de ambas gelatinases estar relacionada a fatores que induzem angiogênese como o gene o *VEGF* (MUNAT *et al.*, 2003).

Relatos na literatura demonstraram que essas MMPs não estão envolvidas apenas no surgimento de gliomas, mas também, nas demais neoplasias cerebrais como meduloblastoma (OZEN *et al.*, 2004), ependimomas (PAGENSTECHEER *et al.*, 2001), tumores pituitários, schwannomas e meningiomas (KACHRA *et al.*, 2001).

Expressão alterada das TIMPs também foi associada aos tumores do SNC. Pagenstecher *et al.* (2001), observaram hiper-expressão de *TIMP-1* em neoplasias do SNC relacionada

principalmente em sítios de neoangiogênese. A hiper-expressão de *TIMP-2* foi relatada como evento freqüentemente observado em gliomas recorrentes por Saxena et al. (1999).

A hiper-expressão de *TIMP-3* foi relatada em gliomas de baixo grau de malignidade, sugerindo que essa proteína possua uma atividade supressora do crescimento tumoral (HUANG et al., 2000). Foi observada também hiper expressão de *TIMP-4* em glioblastoma multiforme (LAL et al., 1999).

OZEN et al (2004) demonstraram associação da expressão preferencial de algumas TIMPs com um determinado tipo histológico em meduloblastomas; *TIMP-3* é mais expressa em meduloblastomas do tipo clássico e *TIMP-2* associada ao meduloblastoma desmoplásico.

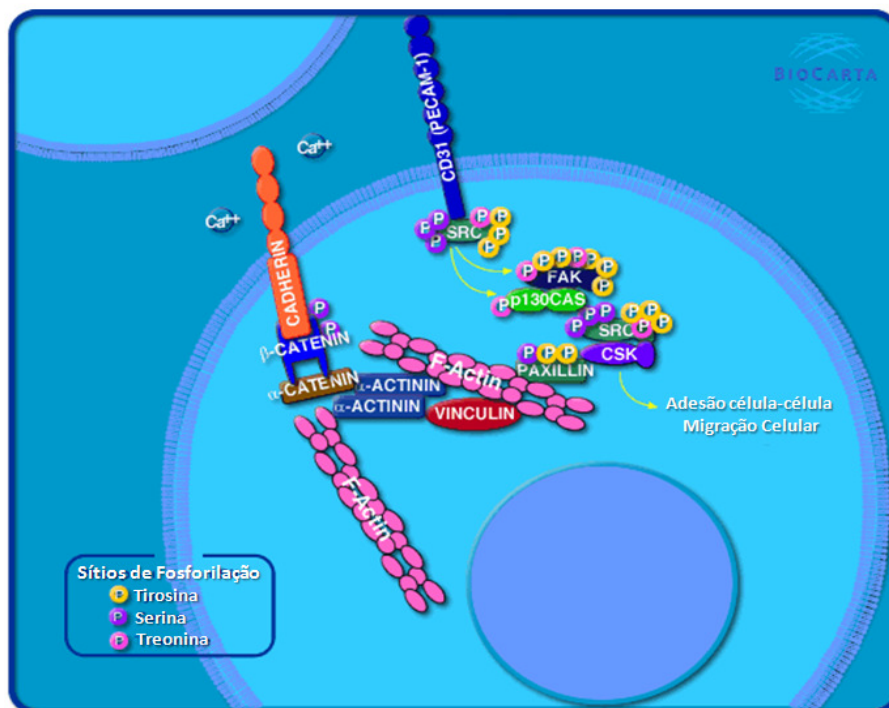
#### 1.4 E-Caderina

As moléculas de adesão celular (MACs) são proteínas que possuem um papel importante na interação célula-célula e entre célula-matrix extracelular. Existem quatro principais classes de MACs: as caderinas, as selectinas, super família das imunoglobulinas e as integrinas (ASANO et al., 2000). As caderinas são proteínas transmembranas que exercem suas funções principalmente por meio de interações homofílicas dependentes de cálcio, caracterizadas por apresentarem um resíduo de aproximadamente 110 aminoácidos em sua porção extracelular, que desempenham papel fundamental nos processos de histogênese, morfogênese e manutenção dos tecidos sólidos (TAKEICHI, 1991; POKUTTA, 2007).

Essas moléculas apresentam expressão diferencial entre os tecidos dos vertebrados e parece ser particularmente complexa no SNC. Essa família é ainda subdividida em E-, N- e P-caderinas (REDIES; TAKEICHI, 1996; REDIES, 2000).

O gene *CDH1*, localizado na porção 16q22.1, codifica a glicoproteína E-caderina, um dos principais membros da superfamília das caderinas dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ , responsável pelas

interações célula-célula nos tecidos epiteliais e que apresenta um papel determinante na formação e manutenção da polaridade celular nesses tecidos. As cateninas citoplasmáticas formam complexos com a E-caderina ligando ao seu domínio carboxi-terminal que permite que se liguem a actina do citoesqueleto, sendo essa interação necessária para a função das células epiteliais e integridade tecidual (NOLLET *et al.*, 1999; YAGI *et al.*, 2000) (Figura 5).



**Figura 5.** Representação esquemática das interações moleculares entre E-caderina e cateninas na manutenção da integridade das junções célula-célula (Adaptado de [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)).

Alterações estruturais e nos níveis de expressão do gene *CDH1* têm sido descritas em muitos tipos de câncer, entre eles o gástrico, de mama e de intestino, onde esse gene atua como típico supressor tumoral (BERX *et al.*, 1998). Alterações na expressão de E-caderina resultam em um fenótipo conhecido como Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM), a mudança de tecido epitelial para o mesenquimal leva a um aumento da mobilidade dessas células, fazendo com que

elas se soltem mais facilmente do tecido epitelial parental (BECKER *et al.*, 2007; GUARINO *et al.*, 2007).

A metilação aberrante do gene *CDH1*, sobreposição de ilhas CpGs, perda de fatores de ligação e/ou reorganização da cromatina são causas da perda/diminuição da expressão de *CDH1*. Os elementos regulatórios *upstream* do gene *CDH1* de camundongos e humanos foram caracterizados. Ambos apresentam em seus promotores dois E-boxes conservados, fundamentais para a especificidade da expressão de E-caderina nos tecidos epiteliais (GIROLDI *et al.*, 1997; UHLMANN *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2004). Os fatores reguladores da transcrição Rb, c-MYC, HNF-4 e PAX-2 são importantes no desenvolvimento do organismo e na tumorigênese, pois estimulam a expressão de *CDH1*. Os fatores Rb e c-MYC atuam conjuntamente com os coativadores AP2, ligando-se ao promotor desse gene e ativando a expressão de E-caderina nas células epiteliais, desempenhando um papel importante na manutenção das junções celulares (BATSCHE *et al.*, 1998).

Alterações no nível de expressão de E-caderina nos tumores neuroepiteliais foram relatadas por alguns autores. Schwechheimer *et al.* (1998) estudaram a expressão de E-caderina em uma série de tumores do SNC, que incluía diferentes tipos de tumores neuroepiteliais, ependimomas, meduloblastomas, adenoma de pituitária, papilomas no plexo coróide. Os autores observaram que E-caderina só era expressa nesses dois últimos tipos tumorais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Utsuki *et al.* (2002), pois não observaram expressão de E-caderina em astrocitomas de alto grau. Ao contrário, verificaram que N-caderina e  $\beta$ -catenina apresentavam imunorreatividade aumentada com o aumento do grau histológico desses tumores. Por outro lado, baixa expressão de E-caderina em astrocitomas foi observada por Howng *et al.* (2002).

---

Redução de E-caderina foi observada em algumas metástases de tumores cerebrais, revelando que essa proteína pode atuar com supressor de invasão tumoral (Arnold *et al.*, 1999). No entanto, os dados na literatura a cerca da expressão do gene *CDH1* nos tumores neuroepiteliais ainda são escassos.

Os recentes avanços na genética e na biologia molecular proporcionaram um grande salto no conhecimento dos eventos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento e progressão das neoplasias do SNC. A avaliação do nível de expressão dos genes envolvidos no surgimento e manutenção das neoplasias do sistema nervoso poderá fornecer informações precisas como: quais genes estão envolvidos com o desenvolvimento de um tipo específico de tumor do SNC, as bases moleculares que poderão auxiliar na classificação histopatológica precisa e o reconhecimento dos diferentes eventos moleculares entre os tipos de tumores do SNC, além de determinar vias genéticas que apontarão alvos de terapia gênica, melhorando assim, o prognóstico dos pacientes acometidos por essas neoplasias, bem como aumentando suas chances de cura.

As dificuldades existentes no combate da capacidade invasiva são os maiores problemas enfrentados no tratamento de tumores do SNC. Essa situação torna fundamental a realização de estudos que contribuam para um melhor entendimento do comportamento biológico dessas neoplasias. A análise de expressão de genes envolvidos nas vias de adesão e migração celular pode fornecer dados importantes para uma melhor escolha da estratégia terapêutica dos pacientes acometidos pelas neoplasias do SNC.

## **2- OBJETIVOS**

---

Foram objetivos deste estudo:

- a) Avaliar e correlacionar a expressão dos genes de adesão e migração celular *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-14 (MT1-MMP)*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-4* e *CDH1*, pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR), em neoplasias do SNC de crianças e adultos assistidos pelo Hospital das Clínicas-FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP e pelo Hospital das Clínicas-FMUSP, São Paulo, SP.
- b) Descrever e comparar a expressão destes genes segundo o tecido de origem tumoral, o diagnóstico histopatológico e o local primário do tumor.
- c) Analisar o impacto da expressão aumentada dos genes de migração e adesão celular na sobrevida global dos pacientes acometidos por astrocitomas de alto grau (graus III e IV), glioblastomas e nos meduloblastomas.

### **3- CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---



### 3.1 Casuística

As amostras utilizadas neste estudo são tumores neuroepiteliais primários do SNC provenientes de pacientes assistidos pelos Serviços de Oncologia Pediátrica e de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), os quais mantêm bancos de tumores aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, processos N° 9375/2003 e 7645/99, respectivamente, e de pacientes assistidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP), São Paulo.

No presente estudo foram avaliados os níveis de expressão dos genes *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP3*, *TIMP4* e *CDH1* em 81 amostras de tumores neuroepiteliais, armazenadas em nitrogênio líquido ou em freezer -80°C, provenientes dos bancos de tecido supracitados, compreendendo amostras do período entre janeiro de 1996 e maio de 2007 e cinco amostras de tecido cerebral, substância branca não neoplásica. Os pacientes ou seus responsáveis diretos foram informados do estudo por meio do termo de consentimento livre e esclarecido e após assinatura do termo foram incluídos no estudo. Este projeto de doutorado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP-USP sob o N°. 11458/2006 (ANEXO).

O grupo de pacientes formado por crianças e adolescentes (0 a 20 anos) compreende 40 amostras de tumores primários do SNC, composto por 26 indivíduos do sexo masculino e 14 do sexo feminino, numa proporção M:F 1,85. A idade média ao diagnóstico do grupo foi de 8,5 anos, com uma mediana e desvio-padrão de 8 ( $\pm 5,1$ ) anos.

O grupo de pacientes adultos (acima de 21 anos) foi composto por 41 indivíduos, divididos em 22 do sexo masculino e 19 do sexo feminino, numa proporção de M:F 1,15. A idade média ao diagnóstico do grupo foi de 45,2 anos, com uma mediana e desvio-padrão de 43,5 ( $\pm 15$ ) anos. Maiores detalhes quanto aos casos estudados estão mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Registros, distribuição por gênero, cor, idade ao diagnóstico, histologia e localização anatômica do grupo de pacientes avaliados no estudo.

Registro	Sexo	Cor	Idade ao diagnóstico	Localização	Diagnóstico
SNC 13	M	Branco	44,2	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
SNC 250	F	Branco	39,5	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 242	F	Branco	4,5	fossa posterior	Astrocitoma Grau I
TU 441	F	Branco	12,2	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 502	M	Branco	9,3	vias ópticas	Astrocitoma Grau I
TU 538	M	Branco	30,2	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 607	M	Branco	2,2	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 627	F	Branco	8,9	coluna vertebral	Astrocitoma Grau I
TU 629	M	Branco	3,6	fossa posterior	Astrocitoma Grau I
TU 640	F	Não-branco	3,1	fossa posterior	Astrocitoma Grau I
TU 654	F	Não-branco	12,0	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 659	M	Branco	6,8	vias ópticas	Astrocitoma Grau I
TU 680	F	Não-branco	3,0	vias ópticas	Astrocitoma Grau I
TU 740	M	Branco	7,1	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 746	F	Não-branco	13,3	vias ópticas	Astrocitoma Grau I
TU 784	M	Branco	13,2	vias ópticas	Astrocitoma Grau I
TU 826	M	Branco	1,3	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 863	M	Branco	11,1	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau I
TU 879	M	Branco	7,3	vias ópticas	Astrocitoma Grau I
TU 905	M	Branco	16,7	vias ópticas	Astrocitoma Grau I
TU 912	M	Branco	3,8	fossa posterior	Astrocitoma Grau I

Continua

<b>254</b>	F	Branco	24,8	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>256</b>	M	Branco	43,5	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>328</b>	M	Não-Branco	39,1	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>341</b>	M	Branco	28,6	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>346</b>	M	Branco	23,1	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>490</b>	M	Branco	35,8	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>577</b>	F	Não-Branco	35,8	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>715</b>	F	Branco	27,3	fossa posterior	Astrocitoma Grau II
<b>806</b>	M	Branco	39,4	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau II
<b>999</b>	M	Branco	25,8	fossa posterior	Astrocitoma Grau II
<b>TU 438</b>	M	Branco	8,0	fossa posterior	Astrocitoma Grau III
<b>TU 788</b>	M	Branco	10,4	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau III
<b>TU 838</b>	M	Branco	16,0	fossa posterior	Astrocitoma Grau III
<b>SNC 08</b>	F	Branco	44,5	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau III
<b>SNC 71</b>	M	Branco	36,6	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau III
<b>SNC 74</b>	M	Branco	39,4	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau III
<b>360</b>	F	Branco	32,1	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau III
<b>514</b>	M	Branco	37,6	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau III
<b>734</b>	M	Não-Branco	31,7	fossa posterior	Astrocitoma Grau III
<b>1036</b>	F	Branco	46,1	hemisférios cerebrais	Astrocitoma Grau III
<b>SNC 01A</b>	F	Branco	46,6	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 05</b>	F	Não-branco	67,5	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 134</b>	M	Branco	24,4	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 06</b>	F	Branco	63,9	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 154</b>	F	Branco	64,2	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 159</b>	F	Branco	54,4	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 14</b>	M	Não-branco	39,8	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 170</b>	F	Branco	68,9	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 21</b>	M	Não-branco	62,5	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 184</b>	M	Branco	63,9	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 199</b>	F	Branco	69,1	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 224</b>	F	Branco	61,1	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 69</b>	M	Branco	69,2	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 85</b>	M	Branco	32,7	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme

Continua

---

<b>SNC 87</b>	M	Não-branco	55,5	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 96</b>	F	Branco	71,9	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 198</b>	M	Branco	18,2	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 191</b>	F	Branco	50,5	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 179</b>	F	Branco	45,5	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 137</b>	M	Branco	45,9	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>TU 781</b>	F	Branco	19,3	hemisférios cerebrais	Glioblastoma Multiforme
<b>SNC 181</b>	M	Branco	23,0	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 100</b>	F	Branco	9,8	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 145</b>	F	Branco	14,0	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 194</b>	M	Branco	1,6	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 323</b>	M	Branco	12	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 335</b>	F	Branco	14	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 426</b>	M	Não-branco	1,5	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 449</b>	F	Branco	8,0	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 467</b>	M	Branco	9	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 483</b>	F	Branco	8,8	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 561</b>	M	Branco	20,2	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 604</b>	M	Não-branco	12,5	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 612</b>	M	Branco	4,0	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 617</b>	M	Branco	4,0	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 706</b>	F	Branco	3,7	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 764</b>	M	Não-branco	4,3	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 776</b>	F	Branco	11,0	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 904</b>	M	Branco	3,1	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>TU 915</b>	M	Branco	6,0	fossa posterior	Meduloblastoma
<b>SNC129</b>	F	Branco	33		Substância Branca
<b>SNC130</b>	F	Branco	34		Substância Branca
<b>SNC148</b>	F	Branco	34		Substância Branca
<b>SNC157</b>	F	Branco	35		Substância Branca
<b>SNC171</b>	F	Branco	41		Substância Branca

---

As entidades histológicas estudadas compreendem os tumores neuroepiteliais, derivados de astrócitos e o de células embrionárias (meduloblastoma) assim divididos: 21 astrocitomas Grau I, 10 astrocitomas Grau II, 10 astrocitomas Grau III, 21 astrocitomas Grau IV (glioblastomas multiformes) e 19 meduloblastomas. Detalhes quanto à distribuição pediátrica e adulta dos casos estudados estão demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Distribuição dos casos pediátricos e adultos de neoplasias de SNC

Diagnóstico	Casos Pediátricos		Casos Adultos	
	<i>n</i>	% dos casos	<i>n</i>	% dos casos
<b>Astrocitomas Grau I</b>	18	45	3	7,3
<b>Astrocitomas Grau II</b>	0	0	10	24,4
<b>Astrocitomas Grau III</b>	3	7,5	7	17,1
<b>Astrocitomas Grau IV</b>	1	2,5	20	48,8
<b>Meduloblastoma</b>	18	45	1	2,4

## 3. 2 Métodos

### 3.2.1 Microdissecção

Todas as amostras de tumor estudadas foram submetidas à microdissecção no Laboratório de Patologia da FMRP-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Neder. Esse procedimento tem como objetivo descartar o máximo de interferentes tais como: tecido necrótico, tecido cerebral normal e avaliar a integridade do tecido tumoral a ser submetido ao estudo molecular.

Para a microdissecção, a amostra foi colocada sobre plataforma previamente resfriada e protegida e imediatamente posicionada na base de corte do criostato. Após um novo congelamento rápido em nitrogênio líquido, a amostra foi então posicionada para o corte. Foram utilizados dois cortes por material com espessura de aproximadamente 8-10 µm, imediatamente capturados com lamínula de vidro, corados por hematoxilina e eosina e avaliados por aposição de imagem.

### 3.2.2 Extração do RNA

Após o procedimento de microdissecção as amostras foram maceradas completamente com o auxílio de nitrogênio líquido, em seguida foi acrescido à amostra 1 mL do reagente TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e processado segundo as especificações do fabricante aqui citadas resumidamente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIZOL® utilizado. Após agitação por 15 segundos, os tubos foram centrifugados a 12,000 RPM por 15 minutos à 4°C. A fase aquosa, correspondente ao RNA, foi coletada e transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico e mantido à -20°C por 18 horas. Depois de

ser centrifugado à 12000 RPM por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com 1 mL de etanol 75%. Após a centrifugação a 7500 RPM por 5 minutos à 4°C, o “pellet” foi diluído em 30 µL de água tratada com DEPC.

### 3.2.3 Síntese do DNA Complementar

Os DNAs complementares foram obtidos a partir do *kit High Capacity cDNA archive set* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segundo as especificações do fabricante, aqui citadas resumidamente. Para a síntese de cDNA por este *kit*, adicionou-se 1 µL de RNA, 2,5µL de buffer, 1 µL de dNTP, 2,5µL de *random primers*, 1,25 µL de *multiscribe* e 0,63 µL de RNAsin. Esta solução foi colocada a 25°C por 10 minutos e, em seguida, 37°C por 120 minutos. Este cDNA foi armazenado em freezer a -20°C até a realização da RQ-PCR.

### 3.2.4 Curvas de Calibração

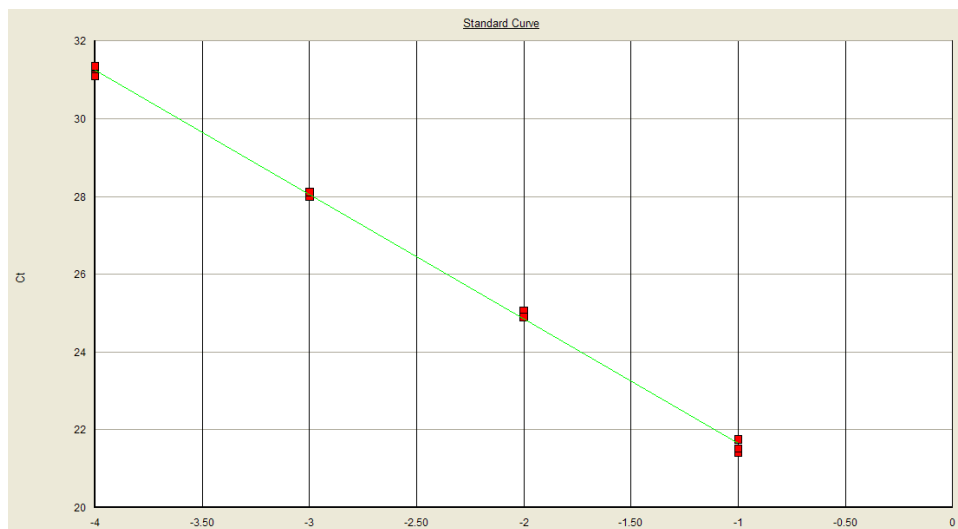
As curvas de calibração foram elaboradas em quadriplicata, a partir de diluições seriadas de cDNA (cDNA diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) derivados das linhagens. Diluições de cDNA da linhagem de glioblastoma U343 foram usadas para construção das curvas de calibração dos genes *MT1-MMP*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3* e *CDH1* e diluições da linhagem celular GLC4/Adr, para o gene *MMP-2*. A amostra de medula normal (MO 020) foi utilizada para o gene *MMP9* e uma amostra de condrossarcoma (Tu 1049) para o gene *MMP-3*.

Foram utilizados pelo menos três pontos para a construção das curvas-padrão, que obtiveram uma eficiência superior a 95%. Somente foram consideradas curvas-padrão

satisfatórias para referência aquelas com *slope* entre 3,1 e 3,9, sendo 3,3 considerado o ideal. As Figuras 6 A e 6B mostram exemplos de construção de curvas-padrão.



**Figura 6 A:** Curva-padrão de diluições seriadas do gene *TIMP-3* fornecidas pelo Aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).



**Figura 6 B:** Curva-calibração do gene *TIMP-3* fornecida pelo Aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).



### 3.2.5 PCR em Tempo Real

O estudo de RQ-PCR foi realizado no aparelho *Gene Amp 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A RQ-PCR foi realizada obedecendo às condições universais já prontas no aparelho que são: pré aquecimento a 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação e quantificação (15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C).

As reações de RQ-PCR foram realizadas com o kit *TaqMan® Universal PCR Master MIX* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que contém AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs (dUTP), referência passiva e tampão otimizado. Para reação de PCR, foram adicionados 6 µL de *TaqMan® Universal PCR Master MIX*, 0,7 µL Sondas TaqMan® (*Assasys-on-Demand™*), e 6 µL de cDNA diluídos à 1:50. As sondas e *primers* TaqMan® utilizadas neste estudo são do tipo *Assasys-on-Demand™*, suas seqüências não são disponibilizadas aos usuários, uma vez que essas foram desenhadas e validadas pelo fabricante.

As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra e para as linhagens celulares e/ou amostras utilizadas na calibração. O *mix* foi distribuído nas placas de polipropileno para 96 reações (*UltraAmp 96-well Semi-Skirt PCR plates*, Sorenson BioScience, Inc, EUA) cobertas com adesivos para microplacas (*Adhesive PCR film*, ABgene). As placas foram centrifugadas a 25°C por 3 minutos a 3000 RPM e então, submetidas à reação. Em todos os experimentos foram utilizadas as mesmas diluições de amostras e de controles, bem como a utilização de um controle negativo (branco).

Somente foram consideradas para análise as amostras de tumores estudadas cuja diferença de amplificação entre as duplicatas não excederam um ciclo e meio, conforme

protocolo descrito por Van Der Veldeb et al. (2003). O valor de 0,1 do *threshold* foi determinado manualmente para todos os genes estudados em todas as corridas de PCR. Em todos os casos, o *threshold* foi fixado na fase exponencial da reação de PCR. Os valores de Ct foram fornecidos pelo *software* do aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® e exportados para análise em uma planilha do MS *Excel*.

A expressão final da amostra foi calculada por meio da equação linear:

$y = ax + b$ , sendo  $y$  = expressão do gene;  $a$  = *slope* da curva;  $x$  = quantificação obtida pelo RQ-PCR (média aritmética do Ct); e  $b$  = *intercept*.

As equações de cada uma das curvas-padrão bem como as eficiências dos *primers* são demonstradas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Equações finais, com valores de *slope* e *intercept*, utilizadas para análise dos dados de RQ-PCR. [valor final ( $y$ ) =  $-slope \times$  valor Ct + *intercept*] e eficiência dos *primers*

Gene	Equação	Eficiência dos <i>primers</i>
<i>MMP2</i>	$y = -3,39x + 16,01$	1,97
<i>MMP3</i>	$y = -3,29x + 23,11$	2,01
<i>MMP9</i>	$y = -3,36x + 20,46$	1,98
<i>MMP14(MT1-MMP)</i>	$y = -3,32x + 19,95$	2,00
<i>TIMP-1</i>	$y = -3,25x + 18,36$	2,03
<i>TIMP-2</i>	$y = -3,36x + 18,19$	1,98
<i>TIMP-3</i>	$y = -3,19x + 18,46$	2,05
<i>TIMP-4</i>	$y = -3,40x + 25,19$	1,97
<i>CDH1</i>	$y = -3,34x + 18,42$	1,99
<i><math>\beta</math>-Gus</i>	$y = -3,39x + 19,72$	1,97

Para normalização dos resultados, foram avaliadas as expressões destes genes também para as linhagens e/ou amostras, já citadas anteriormente, assim como a expressão do gene *housekeeping*  $\beta$ *GUS* em cada amostra estudada.

Assim, a equação final da calibração da expressão é a seguinte:

$$\text{Calibração final } (\Delta\Delta\text{Ct}) = \frac{\text{Valor gene amostra alvo} / \text{valor } \beta\text{GUS amostra alvo}}{\text{Valor gene controle} / \text{valor } \beta\text{GUS controle}}$$

### 3.3 Análises Estatísticas

A comparação das expressões gênicas de tumores entre as diferentes entidades histológicas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para variáveis não-paramétricas e pelo pós-teste de Dunn para análise multivariada. Curvas de sobrevida global (SG) foram construídas a partir do método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida foi realizada pelo teste de *log-rank*. O nível de significância adotado neste estudo foi  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa *Graph Pad Prism* versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## **4- RESULTADOS**

---

## 4.1 Padrões de Expressão dos Genes de Migração e Adesão Celular nos Tumores Neuroepiteliais

### 4.1.1 Quanto à Linhagem Celular dos Tumores

Como mencionado, tumores neuroepiteliais são divididos, resumidamente, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em: tumores astrocíticos, tumores ependimários, de plexo coróide, do parênquima pineal e tumores embrionários (meduloblastomas e neuroectodémicos primitivos – PNET).

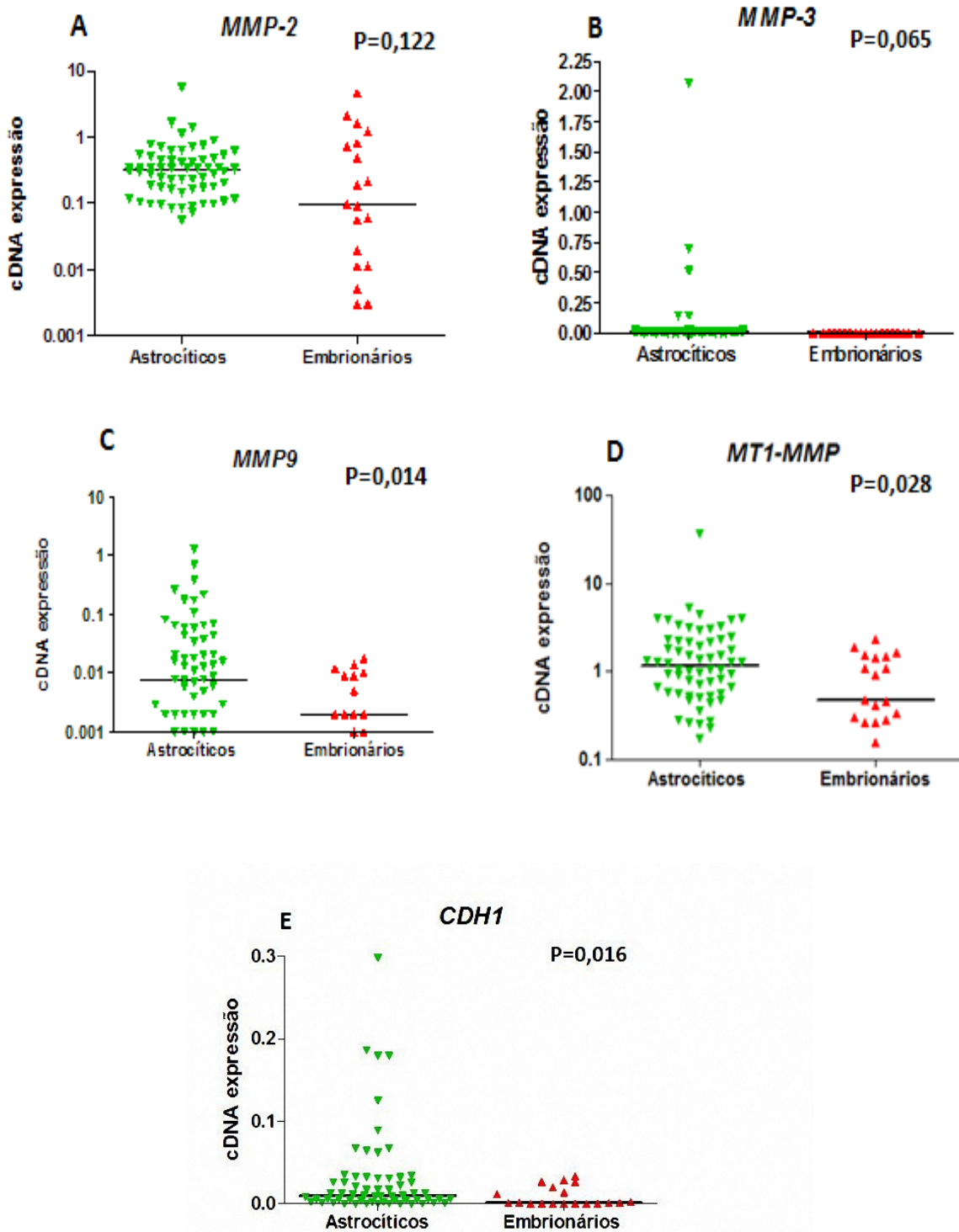
Para a análise do perfil de expressão dos genes de migração (*MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3* e *TIMP-4*) e do gene de adesão celular *CDH1* nos tumores neuroepiteliais originários de diferentes linhagens celulares, as neoplasias estudadas foram divididas em dois grandes grupos: tumores astrocíticos, que compreendem os astrocitomas graus I-IV (n=62), e os embrionários (meduloblastomas) (n=19). As medianas de expressão dos genes estudados, bem como os níveis de significância encontrados, são demonstradas na Tabela 7.

Essa análise revelou que os tumores astrocíticos apresentaram níveis de expressão dos genes *MMP-9*, *MT1-MM*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3*, *TIMP-4* e *CDH1* maiores do que as neoplasias derivadas de células embrionárias. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes *MMP-2* e *MMP-3* entre estes tipos tumorais. Os gráficos de dispersão, bem como a representação da mediana de expressão dessa comparação, podem ser vistas na Figura 7 A-I.

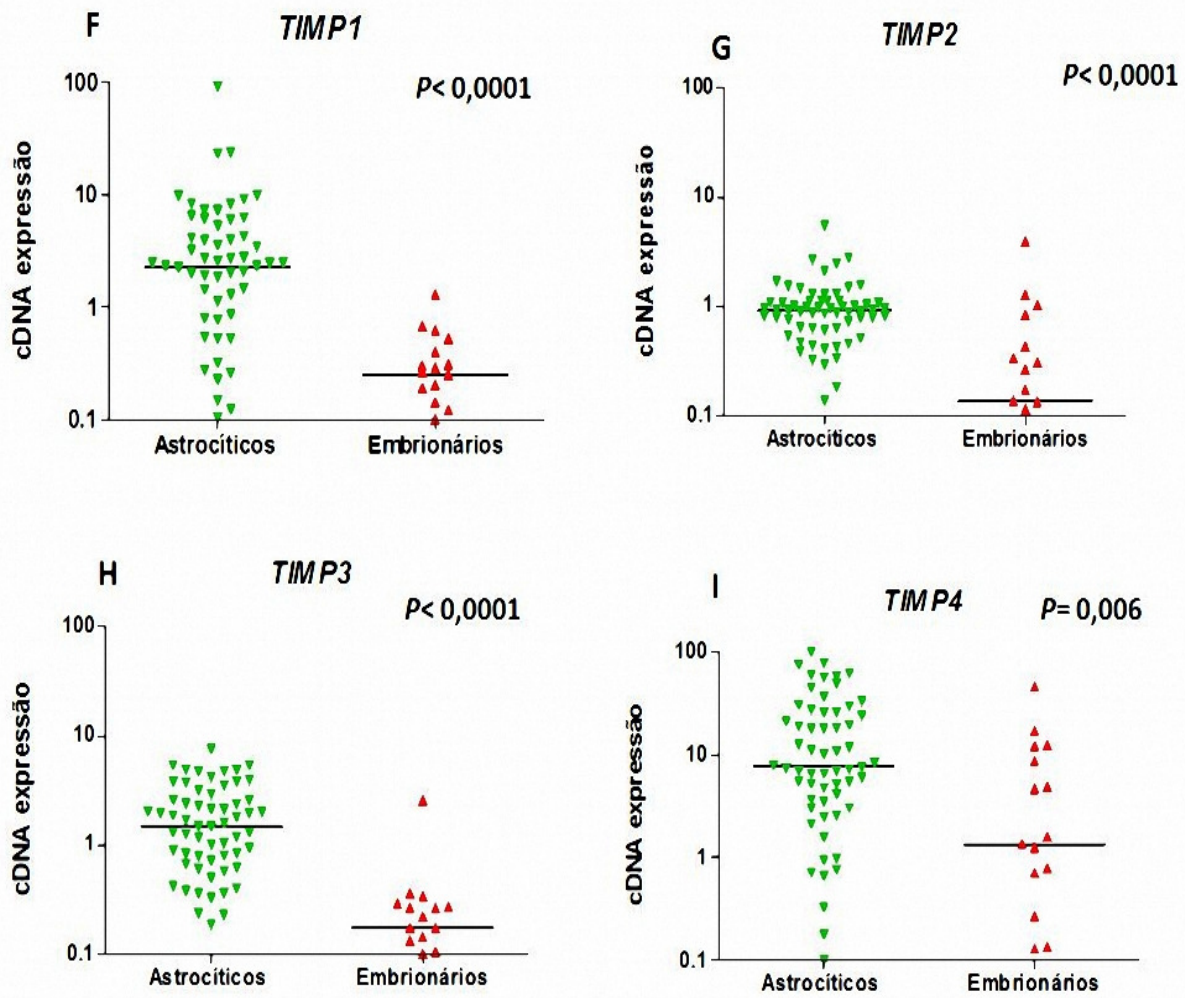
**Tabela 7.** Mediana, percentils (P25-75) e nível de significância dos valores de expressão dos genes de migração e adesão celular em tumores neuroepiteliais nas diferentes linhagens celulares (teste não paramétrico Mann-Whitney).

Genes	Tumores astrocíticos (n=62)		Tumores embrionários (n=19)		P
	Mediana	P25-75	Mediana	P25-75	
<i>MMP-2</i>	0,32	0,16-0,49	0,096	0,01-0,80	0,1227
<i>MMP-3</i>	0,00	0,00-0,008	0,00	0,00-0,00	0,0652
<i>MMP-9</i>	0,00	0,00-0,04	0,002	0,00-0,009	0,0148*
<i>MT1-MMP</i>	1,15	0,56-2,28	0,48	0,28-1,46	0,0282*
<i>TIMP-1</i>	2,26	0,41-4,72	0,25	0,10-0,40	<0,0001*
<i>TIMP-2</i>	0,91	0,62-1,11	0,13	0,05-0,43	<0,0001*
<i>TIMP-3</i>	1,48	0,64-2,75	0,17	0,08-0,27	<0,0001*
<i>TIMP-4</i>	7,74	3,23-26,44	1,34	0,13-12,13	0,0064*
<i>CDH1</i>	0,01	0,00-0,003	0,001	0,00-0,02	0,0168*

\* Diferenças estatísticas significativas



**Figura 7.** Apresentação dos níveis de expressão dos genes estudados e suas medianas de expressão nos grupos de tumores estudados (Teste Mann-Whitney). Continua...



**Figura 7.** Apresentação dos níveis de expressão dos genes estudados e suas medianas de expressão nos grupos de tumores estudados (Teste Mann-Whitney). Continuação



## 4.2 Quanto ao diagnóstico histopatológico dos tumores

Para a melhor avaliação do papel dos genes de migração e adesão celular no desenvolvimento e progressão dos tumores neuroepiteliais, foram realizadas comparações dos níveis de expressão dos genes estudados entre os diferentes tipos histológicos dos tumores e o tecido normal. O grupo de tumores astrocíticos foi agrupado em duas categorias: tumores de baixo grau de malignidade (grau I e II, n= 31) e tumores de alto grau de malignidade (grau III e IV, n=31).

Essa análise foi ainda subdividida para se tornar mais didática. Primeiramente, foram comparadas as expressões entre os tumores de baixo grau *versus* alto grau de malignidade *versus* o tecido não neoplásico (substância branca). Em seguida, foi realizada comparação apenas entre os tumores astrocíticos de baixo grau *versus* alto grau de malignidade e finalmente comparação entre os tumores astrocíticos de baixo grau *versus* alto grau de malignidade *versus* meduloblastomas. Análises comparativas envolvendo os meduloblastomas e o tecido cerebral não neoplásico não foram realizadas visto que substância branca não corresponde à contraparte normal dos meduloblastomas. O perfil de expressão de cada gene será discutido individualmente nas secções subseqüentes.

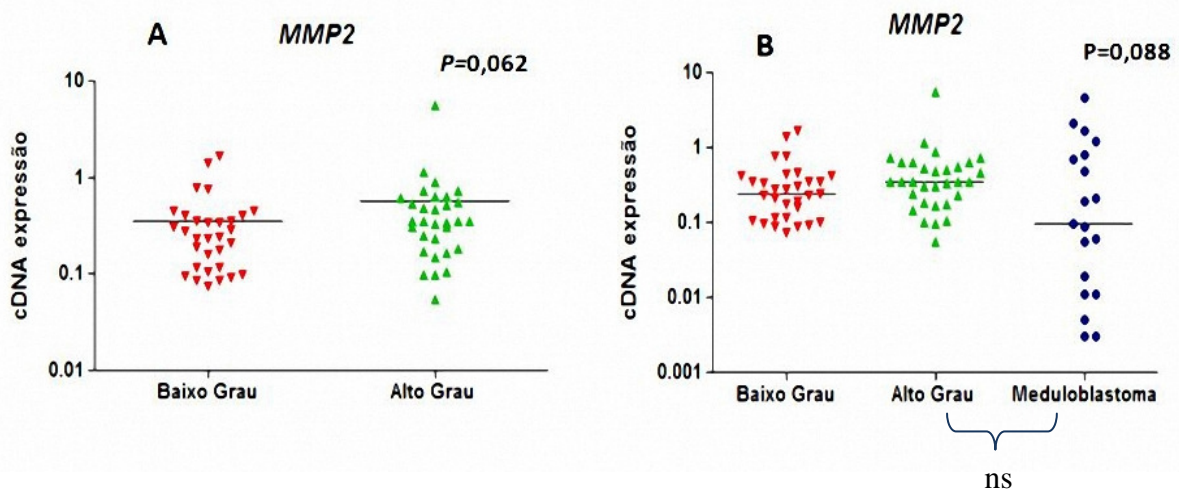
### 4.2.1 *MMP-2* (Gelatinase A)

A análise do nível de expressão do gene *MMP-2* revelou que tumores astrocíticos expressam níveis mais elevados desse gene do que as amostras de tecido não neoplásico. As diferenças dos níveis de expressão entre as entidades histológicas estudadas podem ser visualizadas na Tabela 8. Na comparação realizada apenas entre os astrocitomas de

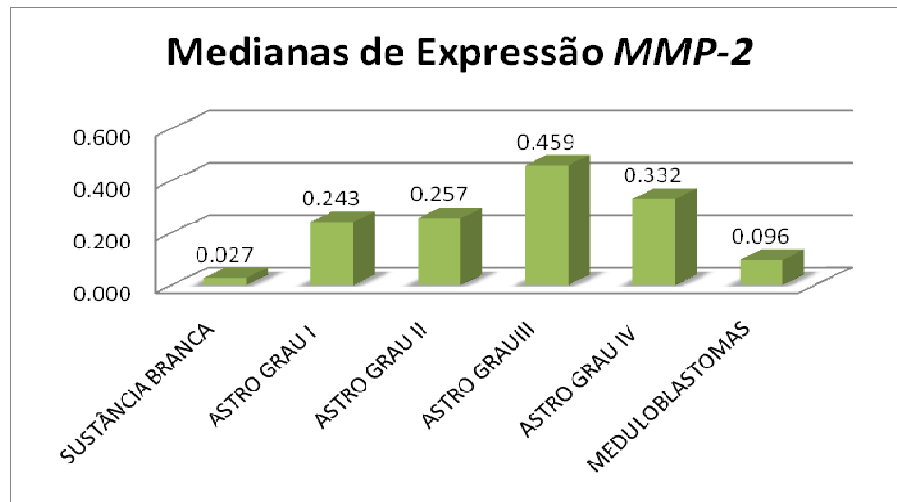
baixo e alto grau de malignidade não foi observada diferença significativa da expressão do gene *MMP-2* (Figura 8A). O mesmo foi observado na comparação realizada entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Figuras 8B). O perfil da expressão do gene *MMP-2* nas amostras estudadas é apresentado na Figura 9.

**Tabela 8.** Comparação estatística da expressão do gene *MMP-2* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	<i>P</i>
Normal vs Baixo Grau	< 0,01
Normal vs Alto Grau	< 0,001
Baixo Grau vs Alto Grau	ns



**Figura 8.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *MMP-2* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *MMP-2* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).



**Figura 9.** Perfil da expressão do gene *MMP-2* nas amostras estudadas.

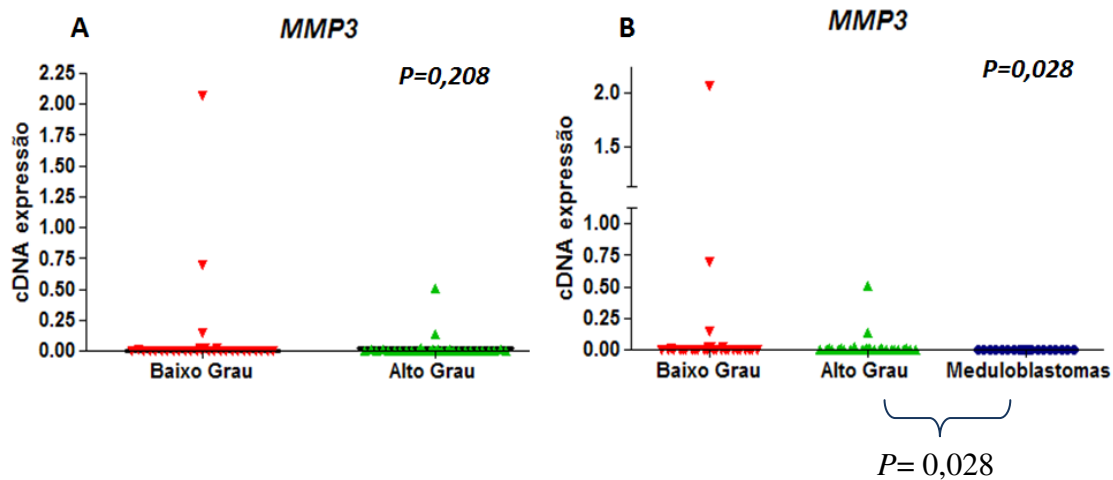
#### 4.2.2 *MMP-3* (Estromalisina 1)

A análise da expressão do gene *MMP-3* entre a substância branca e os astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade não revelou nenhuma diferença significativa conforme mostrado na Tabela 9.

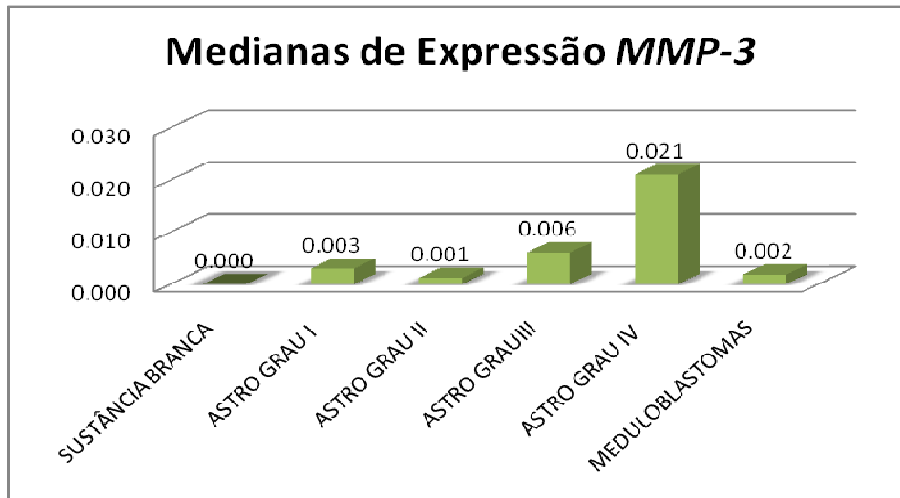
Resultado semelhante foi observado quando comparados os níveis de expressão do gene *MMP-3* entre os dois grupos de tumores astrocíticos (Figura 10 A). Entretanto, a análise comparativa entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas revelou que os astrocitomas de alto grau de malignidade apresentam maior nível de expressão em relação aos meduloblastomas (Figura 10 B). Os níveis de expressão entre os astrocitomas de baixo grau e os meduloblastomas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. O perfil da expressão do gene *MMP-3* nas amostras estudadas é apresentado na Figura 11.

**Tabela 9.** Comparação estatística da expressão do gene *MMP-3* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	<i>P</i>
Normal vs Baixo Grau	ns
Normal vs Alto Grau	ns
Baixo Grau vs Alto Grau	ns



**Figura 10.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *MMP-3* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *MMP-3* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).



**Figura 11.** Perfil da expressão do gene *MMP-3* nas amostras estudadas.

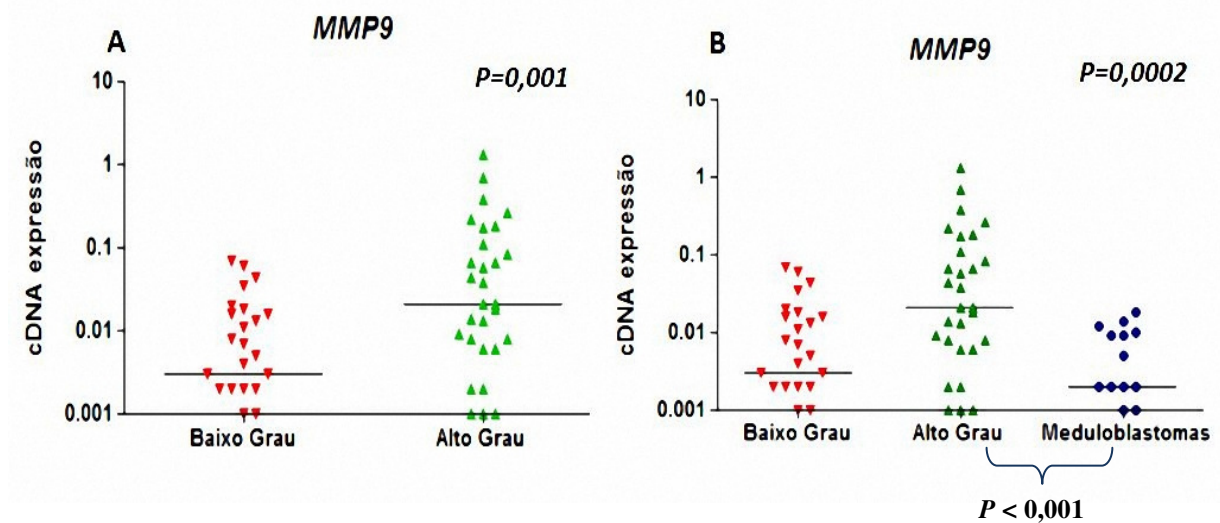
#### 4.2. 3 *MMP-9* (Gelatinase B)

A comparação dos níveis de expressão do gene *MMP-9* entre os tumores astrocíticos e tecido não tumoral revelou que os astrocitomas apresentam maiores níveis de *MMP-9* em relação ao tecido não neoplásico. As diferenças de expressão entre os tumores de baixo grau e tecido normal não foram significativas conforme demonstrado na Tabela 10.

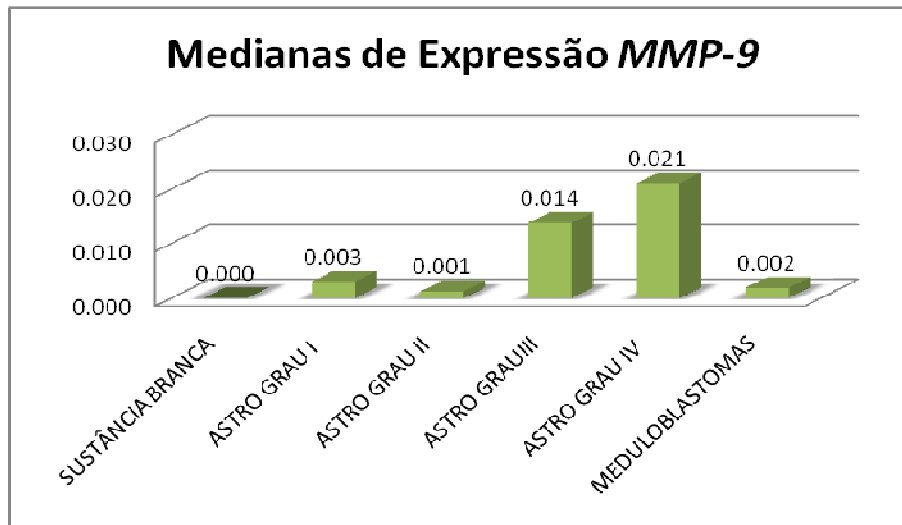
Quando comparados somente os dois grupos de tumores astrocíticos, a expressão mais elevada do gene *MMP-9* nos astrocitomas de alto grau torna-se mais evidente (Figura 12 A). Os níveis de expressão de *MMP-9* nos meduloblastomas são semelhantes aos observados nos astrocitomas de baixo grau. Os astrocitomas de alto grau apresentaram maior expressão desse gene frente aos meduloblastomas (Figura 12 B). O perfil de expressão do gene *MMP-9* nas amostras estudadas é apresentado na Figura 13.

**Tabela 10.** Comparação estatística da expressão do gene *MMP-9* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	<i>P</i>
Normal vs Baixo Grau	ns
Normal vs Alto Grau	< 0,001
Baixo Grau vs Alto Grau	< 0,01



**Figura 12.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *MMP-9* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *MMP-9* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).



**Figura 13.** Perfil de expressão do gene *MMP-9* nas amostras estudadas.

#### 4.2.4 *MT1-MMP (MMP-14)*

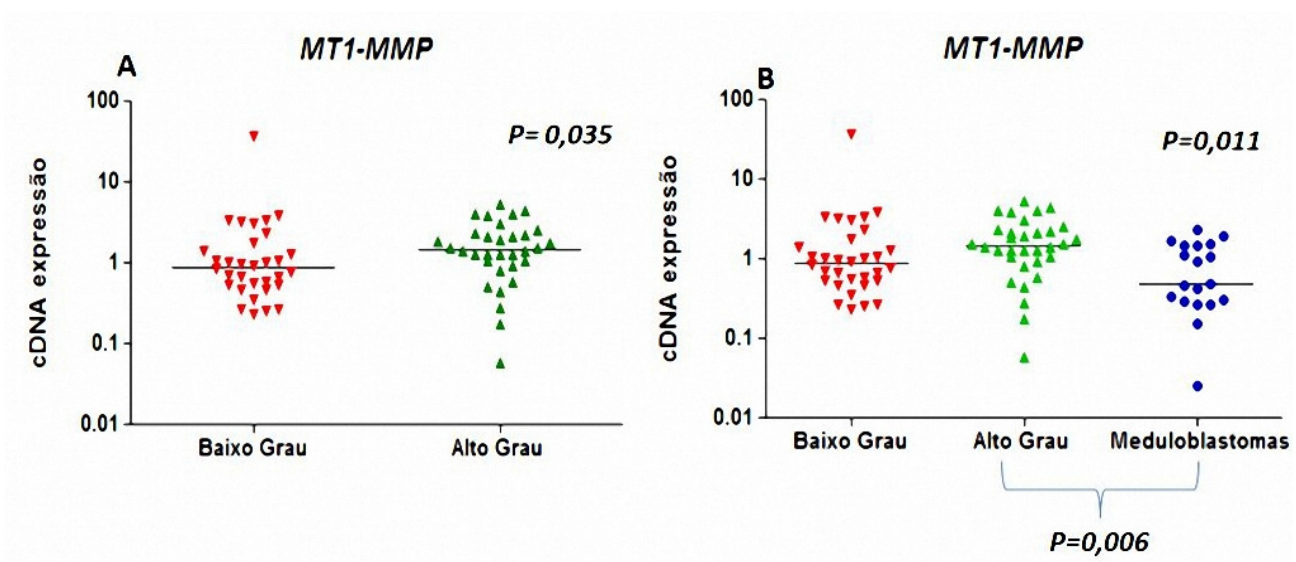
A comparação do nível de expressão do gene *MT1-MMP* entre a substância branca e os astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade, revelou que os maiores níveis de expressão do gene *MT1-MMP* são encontrados nos tumores astrocíticos, conforme apresentado na Tabela 11.

A análise comparativa realizada apenas entre os grupos de astrocitomas revelou que, os tumores de alto grau de malignidade apresentam maior expressão do gene *MT1-MMP*, frente aos tumores de baixo grau de malignidade (Figura 14 A). Não foram observadas diferenças significativas entre os astrocitomas de baixo grau e os meduloblastomas. Entretanto, observou-se que os astrocitomas de alto grau de malignidade apresentaram maior nível de expressão frente aos meduloblastomas (Figura

14 B). O perfil de expressão do gene *MT1-MMP* nas amostras estudadas é apresentado na Figura 15.

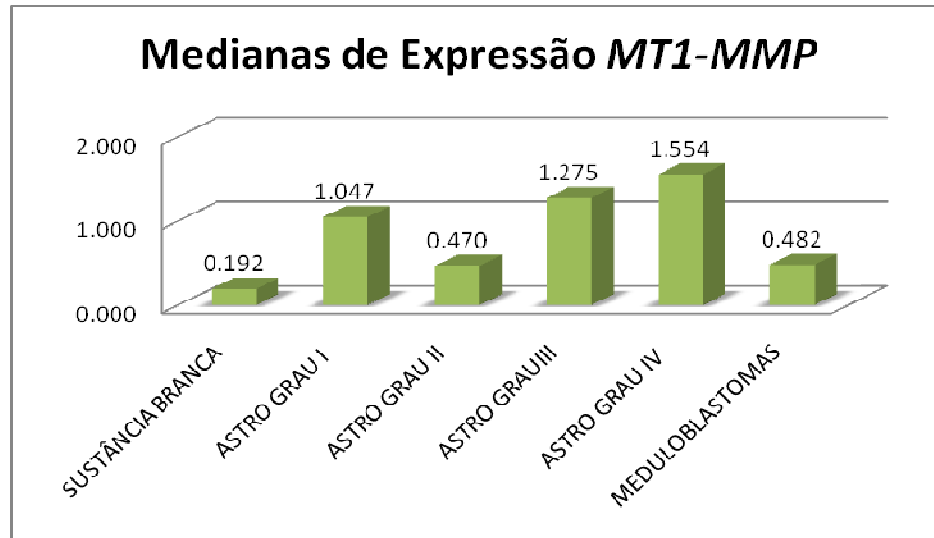
**Tabela 11.** Comparação estatística da expressão do gene *MT1-MMP* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	<i>P</i>
Normal vs Baixo Grau	< 0,05
Normal vs Alto Grau	< 0,001
Baixo Grau vs Alto Grau	0,035



**Figura 14.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *MT1-MMP* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *MT1-MMP* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).





**Figura 15.** Perfil de expressão do gene *MT1-MMP* nas amostras estudadas.

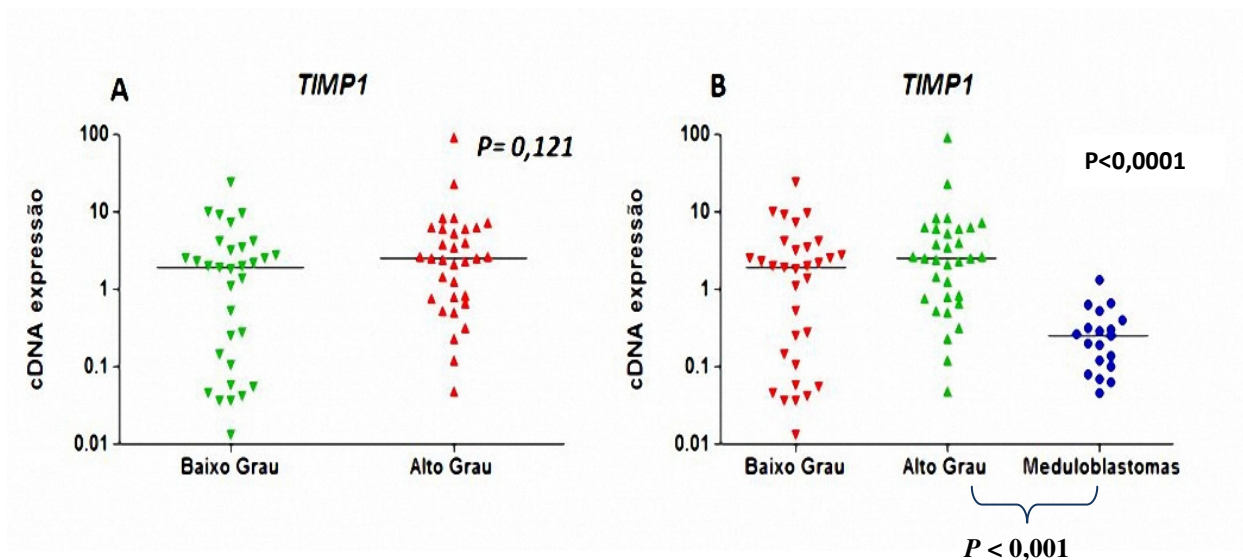
#### 4. 2.5 *TIMP-1*

A análise do nível de expressão do gene *TIMP-1* revelou que os tumores astrocíticos apresentam maiores níveis de expressão desse gene em relação ao tecido não neoplásico estudado, conforme apresentado na Tabela 12.

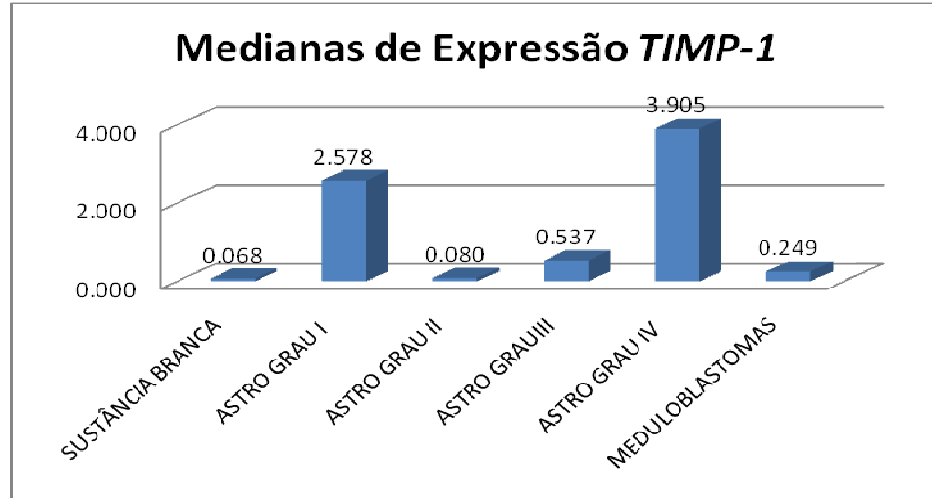
Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *TIMP-1* nas comparações diretas entre os tumores astrocíticos de baixo e alto grau (Figura 16A). Diferenças significativas foram observadas entre os tumores astrocíticos de baixo grau e de alto grau de malignidade e os meduloblastomas (Figura 16B). O perfil de expressão do gene *TIMP-1* nas amostras estudadas é apresentado na Figura 17.

**Tabela 12.** Comparação estatística da expressão do gene *TIMP-1* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	P
Normal vs Baixo Grau	< 0,05
Normal vs Alto Grau	< 0,01
Baixo Grau vs Alto Grau	ns



**Figura 16.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *TIMP-1* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *TIMP-1* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).



**Figura 17.** Perfil de expressão do gene *TIMP-1* nas amostras estudadas.

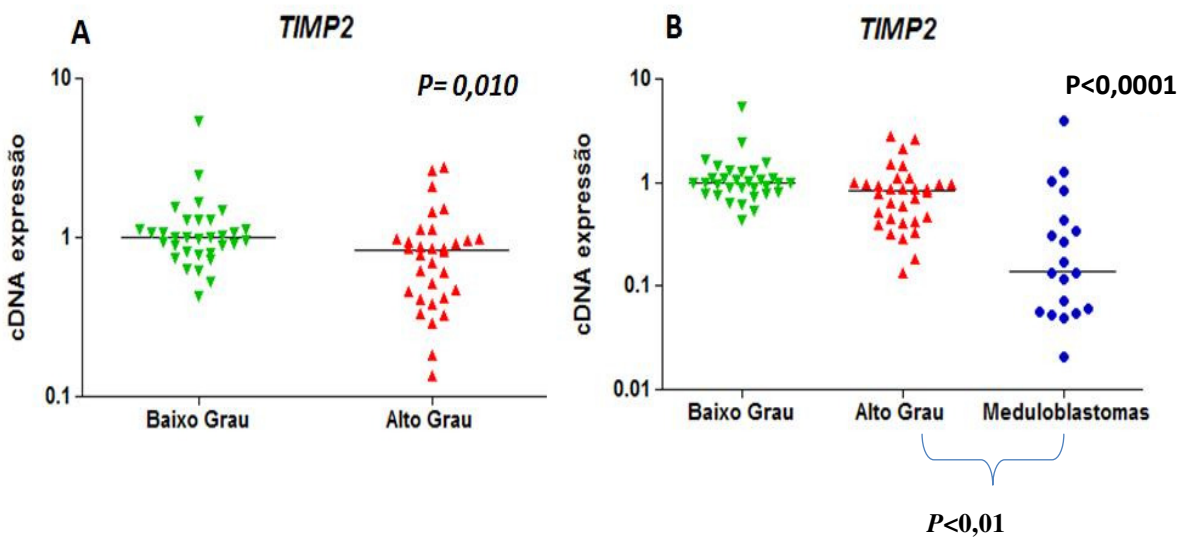
#### 4.2.6 *TIMP-2*

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão de *TIMP-2* entre o tecido não neoplásico e os tumores astrocíticos estudado, conforme apresentado na Tabela 13.

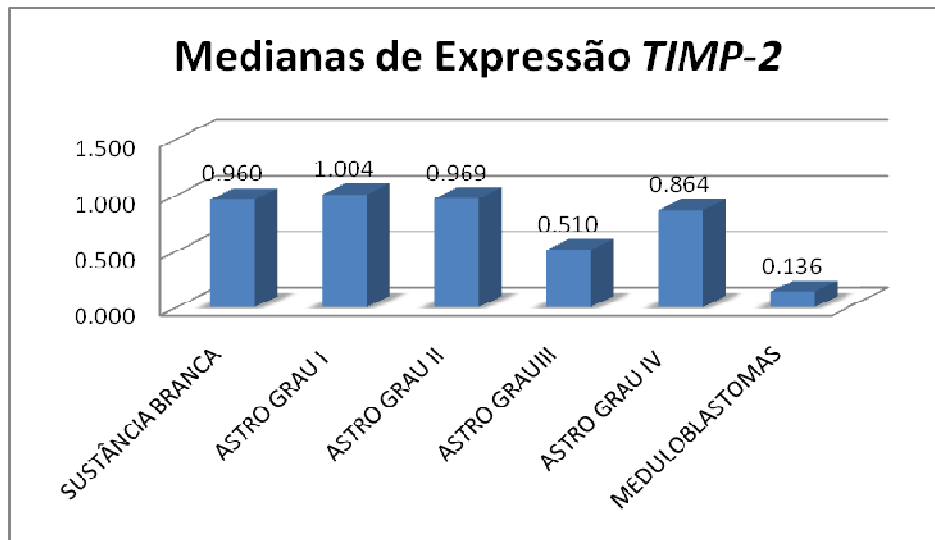
Quando a análise comparativa desse gene é realizada apenas entre os grupos de astrocitomas, observou-se que o nível de expressão de *TIMP-2* em astrocitomas de baixo grau é mais elevado do que o observado nos tumores astrocíticos de alto grau de malignidade (Figura 18 A). Foi observado também, que tanto os astrocitomas de baixo grau quanto os tumores de alto grau, apresentaram níveis de expressão de *TIMP-2* maiores que os observados em meduloblastomas (Figura 18B). O perfil de expressão do gene *TIMP-2* nas amostras estudadas é apresentado na Figura 19.

**Tabela 13.** Comparação estatística da expressão do gene *TIMP-2* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	P
Normal vs Baixo Grau	ns
Normal vs Alto Grau	ns
Baixo Grau vs Alto Grau	< 0,05



**Figura 18.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *TIMP-2* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *TIMP-2* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).



**Figura 19.** Perfil de expressão do gene *TIMP-2* nas amostras estudadas

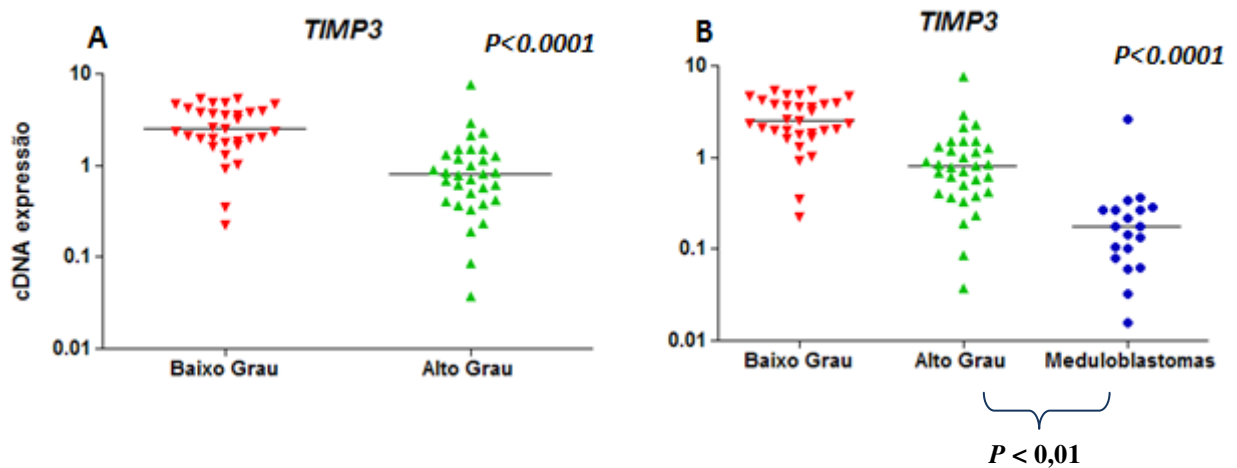
#### 4. 2.7 *TIMP-3*

Observou-se que o nível de expressão do gene *TIMP-3* nos tumores astrocíticos é significativamente maior quando comparados ao do tecido normal estudado, sobretudo nos astrocitomas de baixo grau. Os níveis de expressão de *TIMP-3* no tecido não tumoral são semelhantes aos observados nos tumores astrocíticos de alto grau, conforme exposto na Tabela 14.

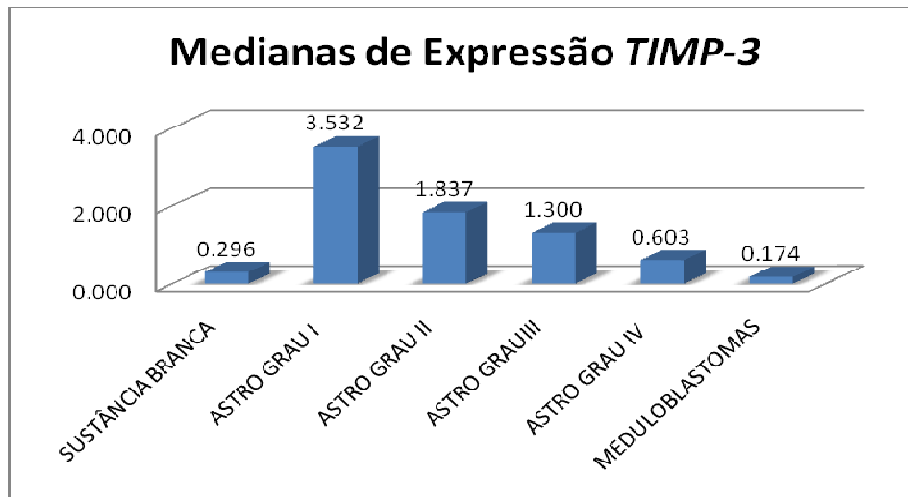
Os resultados obtidos pela comparação direta entre os astrocitomas de baixo grau com os de alto grau de malignidade mostraram que os primeiros apresentam maiores níveis de expressão do gene *TIMP-3* (Figura 20A). Os tumores astrocíticos de baixo grau e de alto grau de malignidade apresentam maior expressão de *TIMP-3* quando comparados com os meduloblastomas (Figura 20B). O perfil de expressão do gene *TIMP-3* nas amostras estudadas é apresentado na Figura 21.

**Tabela 14.** Comparação estatística da expressão do gene *TIMP-3* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	P
Normal vs Baixo Grau	< 0,001
Normal vs Alto Grau	ns
Baixo Grau vs Alto Grau	< 0,001



**Figura 20.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *TIMP-3* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *TIMP-3* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).



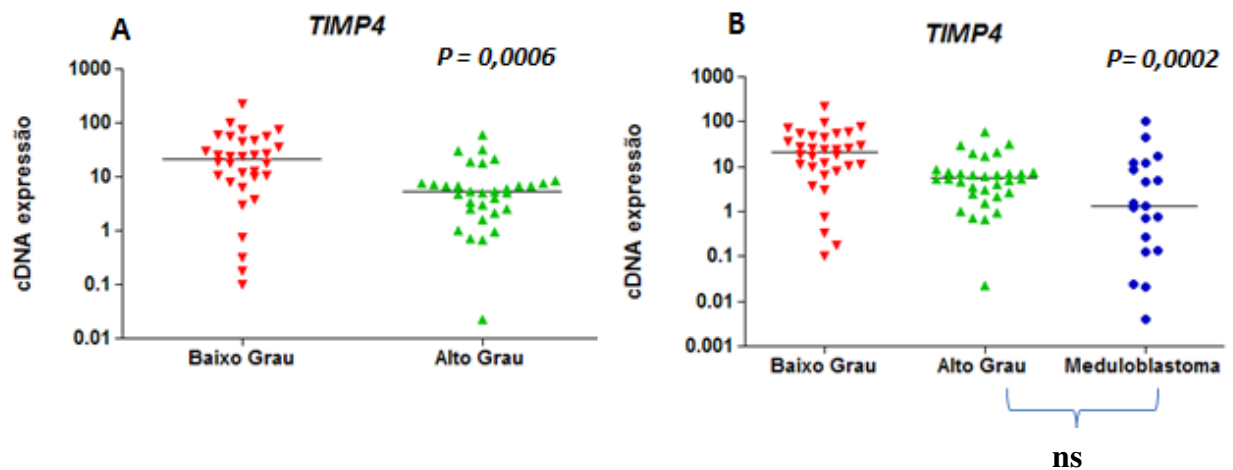
**Figura 21.** Perfil de expressão do gene *TIMP-3* em todas as amostras estudadas.

#### 4. 2.8 *TIMP-4*

Nas comparações realizadas entre os grupos de tumores astrocíticos e a substância branca não neoplásica, foram observados níveis de expressão significativamente maiores nos tumores astrocíticos quando comparadas ao tecido normal, conforme demonstrado na Tabela 15. A comparação direta do nível de expressão desse gene entre os grupos de tumores astrocíticos revelou que os astrocitomas de baixo grau possuem níveis de expressão do gene *TIMP-4* mais elevados (Figura 22A). As análises comparativas dos níveis de expressão de *TIMP-4* entre os graus de malignidade dos tumores astrocíticos e os meduloblastomas revelaram que os astrocitomas de baixo grau apresentaram maior expressão desse gene em relação aos meduloblastomas. Os níveis de expressão de *TIMP-4* observados nos astrocitomas de alto grau e meduloblastomas foram semelhantes (Figura 22B). O perfil de expressão do gene *TIMP-4* em todas as amostras estudadas é apresentado na Figura 23.

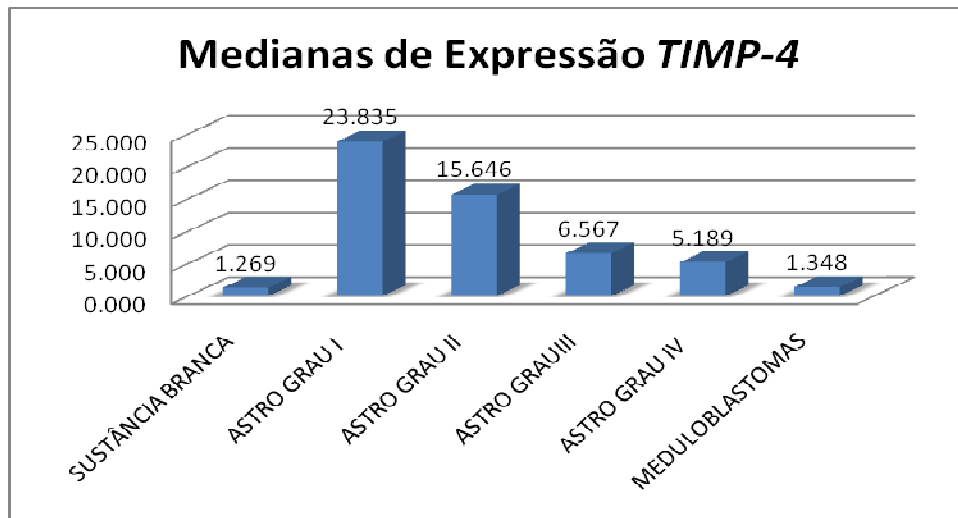
**Tabela 15** Comparação estatística da expressão do gene *TIMP-4* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	P
Normal vs Baixo Grau	< 0,01
Normal vs Alto Grau	0,01
Baixo Grau vs Alto Grau	< 0,01



**Figura 22.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *TIMP-4* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *TIMP-4* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).





**Figura 23.** Perfil de expressão do gene *TIMP-4* em todas as amostras estudadas.

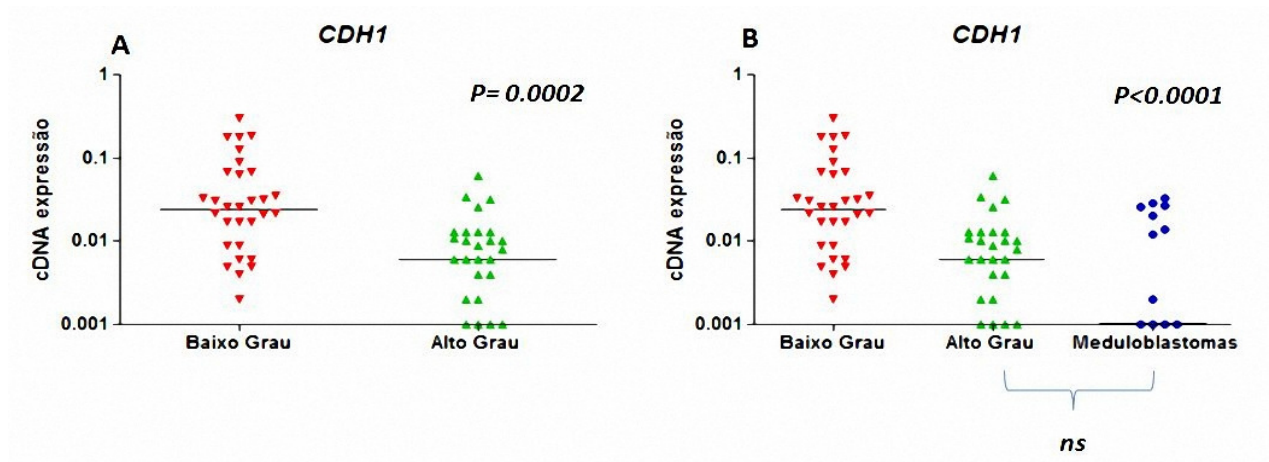
#### 4.2.9 *CDH1*

Observou-se que os níveis de expressão do gene da E-caderina foram maiores nas amostras de tecido cerebral normal do que nas amostras de tumores astrocíticos. Os astrocitomas de baixo grau também apresentaram níveis de expressão maiores que os tumores de alto grau de malignidade, conforme apresentado na Tabela 16 e na Figura 24 A.

A comparação do nível de expressão desse gene entre os grupos de astrocitomas e os meduloblastomas, revelou que os astrocitomas de baixo grau apresentaram maior expressão do gene *CDH1* frente aos meduloblastomas, enquanto que, os meduloblastomas e os astrocitomas de alto grau apresentaram níveis semelhantes de expressão desse gene (Figura 24 B).

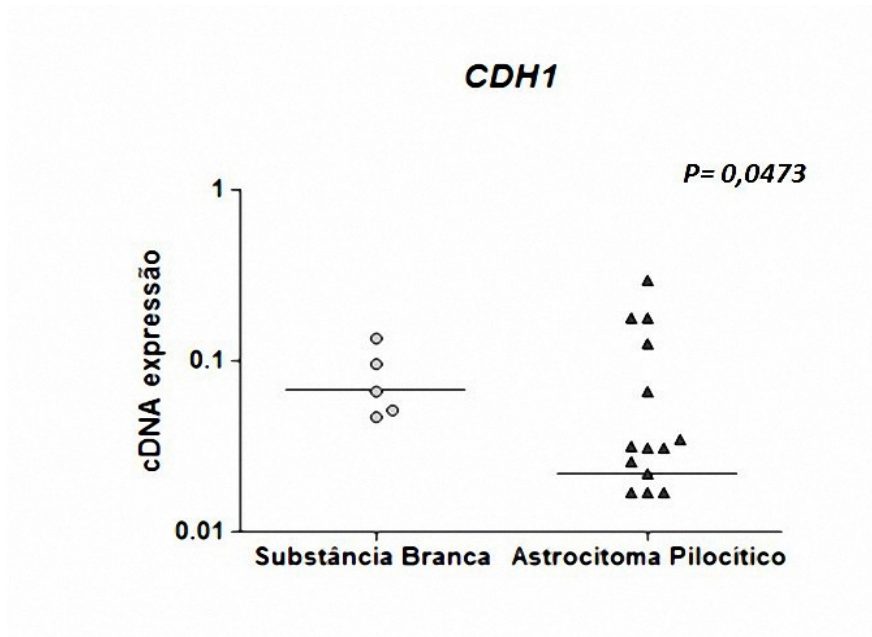
**Tabela 16.** Comparação estatística da expressão do gene *CDH1* entre os tumores astrocíticos e o tecido não neoplásico (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Tipos Histológicos	<i>P</i>
Normal vs Baixo Grau	< 0,05
Normal vs Alto Grau	< 0,001
Baixo Grau vs Alto Grau	< 0,001

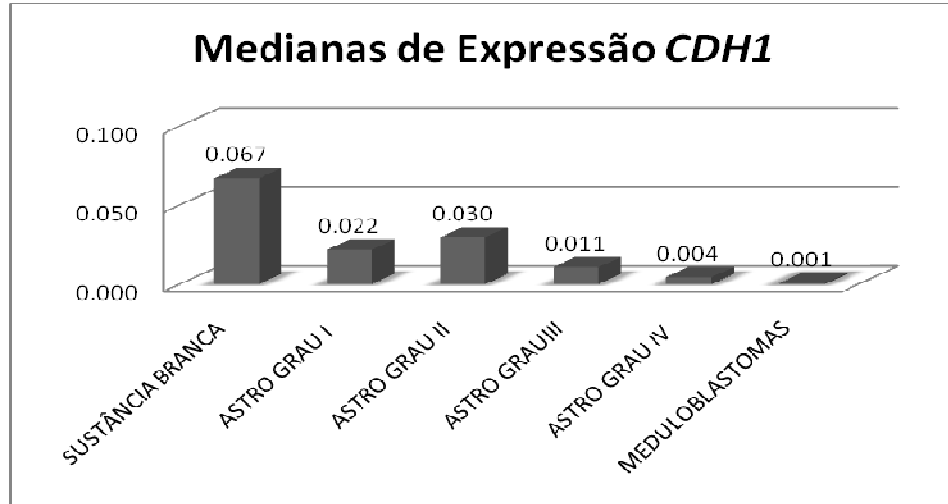


**Figura 24.** (A) Comparações estatísticas da expressão de *CDH1* entre Astrocitomas de baixo e alto grau de malignidade (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). (B) Comparação estatística da expressão de *CDH1* entre os grupos de tumores astrocíticos e os meduloblastomas (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis).

Na tentativa de elucidar em que momento da progressão tumoral se inicia a diminuição da expressão da E-caderina, foi realizado a comparação direta do tecido normal com os astrocitomas de grau I de malignidade. Essa comparação revelou que o tecido normal apresenta maior nível de expressão de *CDH1*, demonstrado que a diminuição da expressão da E-caderina parece ser um evento precoce no desenvolvimento dos tumores neuroepiteliais (Figura 25). Uma visão geral do perfil de expressão do gene *CDH1* nas amostras estudadas é apresentada na Figura 26.



**Figura 25.** Comparação estatística entre tecido não neoplásico *versus* astrocitomas pilocíticos (Grau I).



**Figura 26.** Perfil de expressão do gene *CDH1* em todas as amostras estudadas

### 4.3 Quanto ao Local Primário de Origem Tumoral

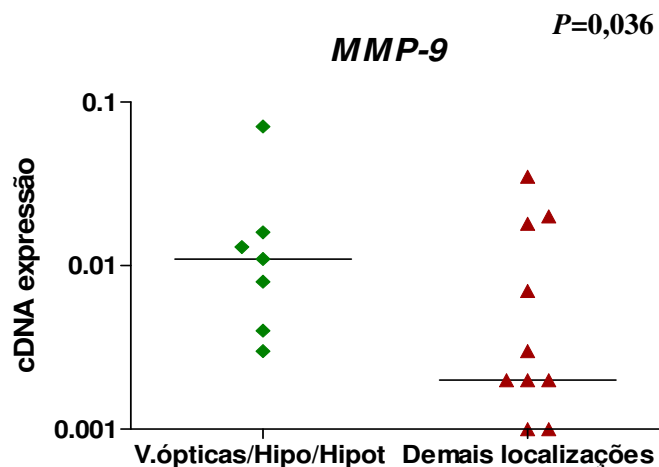
Os astrocitomas grau I de malignidade, também conhecidos, como astrocitomas pilocíticos são tumores com características benignas com baixo poder invasivo, que se originam geralmente nos hemisférios cerebrais. Eventualmente, algumas dessas neoplasias emergem em outras localizações como: vias ópticas, hipotálamo e na hipófise. Esse subgrupo de astrocitomas pilocíticos costuma apresentar um perfil epidemiológico, evolução clínica e padrão de resposta à quimioterapia e/ou radioterapia diferenciados, sob os aspectos clínico-biológicos estes tumores costumam ser bem mais agressivos que os demais astrocitomas pilocíticos localizados nos hemisférios cerebrais.

Para avaliar se há algum envolvimento dos genes de migração e adesão celular no comportamento diferenciado desse subgrupo de neoplasias cerebrais avaliou-se o perfil de expressão desses genes nos astrocitomas pilocíticos, separando aqueles que se originaram no hipotálamo/hipófise e vias ópticas dos de demais localizações (supratentoriais, fossa posterior e medula espinhal). A análise comparativa entre os grupos de astrocitomas pilocíticos estão demonstradas na Tabela 17.

O gene *MMP-9* apresentou expressão significativamente maior nos tumores localizados no hipotálamo/hipófise/vias ópticas em relação ao grupo de tumores das demais localizações. Essa característica pode ser um dos fatores responsáveis pelo comportamento biológico-clínico desse grupo de tumores (Figura 27).

**Tabela 17:** Valores da mediana, percentis 25-75 e nível de significância para os genes de migração e adesão celular estudados quanto ao local de origem do tumor (teste não paramétrico Mann-Whitney).

Genes	hipotálamo/hipófise/vias ópticas (n=7)		Demais localizações (n=14)		P
	mediana	P25-75	mediana	P25-75	
<i>MMP-2</i>	0,309	0,116-0,444	0,225	0,130-0,606	0,852
<i>MMP-3</i>	0,000	0,00-0,002	0,000	0,000-0,006	0,907
<i>MMP-9</i>	<b>0,011</b>	<b>0,004-0,016</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000-0,012</b>	<b>0,036*</b>
<i>MT1-MMP</i>	1,259	0,939-3,056	1,025	0,621-3,305	0,852
<i>TIMP-1</i>	2,230	1,839-2,754	3,365	0,209-8,509	0,737
<i>TIMP-2</i>	1,087	0,938-1,300	0,976	0,802-1,340	0,391
<i>TIMP-3</i>	2,558	1,958-4,198	3,623	2,038-4,818	0,654
<i>TIMP-4</i>	25,51	17,69-36,33	17,42	1,885-75,75	0,970
<i>CDH1</i>	0,022	0,009-0,179	0,021	0,005-0,033	0,478



**Figura 27.** Apresentação dos níveis de expressão do gene *MMP-9* e suas medianas de expressão nos grupos de astrocitomas pilocíticos de diferentes localizações (Teste não paramétrico Mann-Whitney).

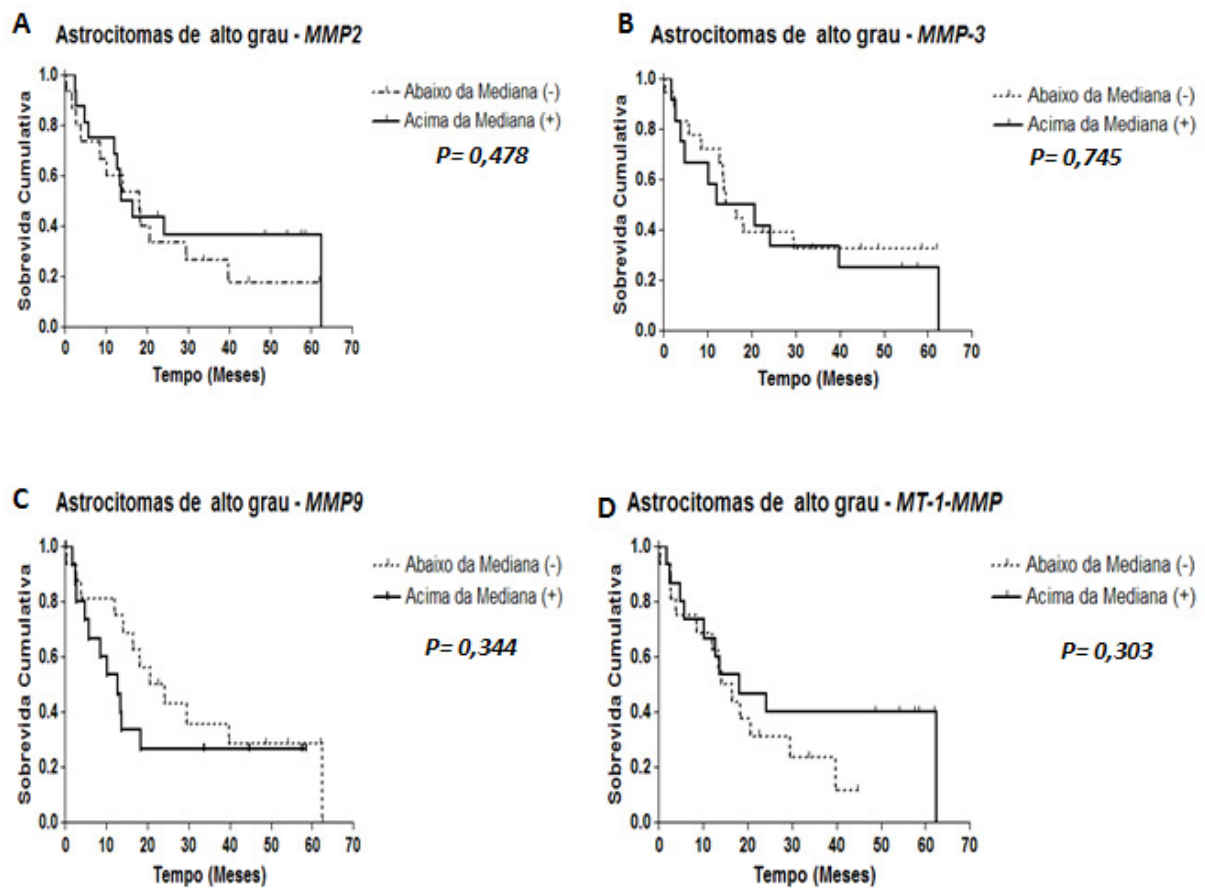
#### 4.4 Quanto à sobrevida global

Para se avaliar o possível impacto da expressão dos genes de migração e adesão celular na sobrevida global nos pacientes com tumores neuroepiteliais, estes foram divididos em dois grupos distintos. Pacientes que apresentavam valores de expressão abaixo da mediana foram classificados como hipoexpressos para aquele gene de estudo; de forma semelhante, pacientes com valor de expressão do gene acima da mediana foram considerados como hiperexpressos. A sobrevida global foi avaliada nos pacientes acometidos por astrocitomas de alto grau (graus III e IV), por glioblastomas isoladamente, visto que esse é o tumor de linhagem astrocítica mais agressivo, e também nos pacientes acometidos por meduloblastomas.

Os pacientes com diagnóstico de astrocitomas de baixo grau (astrocitomas grau I e II) não foram avaliados quanto ao impacto dos genes de migração e adesão celular na sobrevida global. As curvas de sobrevida global foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e a validação destas realizada pelo teste estatístico de *log-rank*. A Figura 28 (A-I) demonstra as curvas de sobrevida dos pacientes com astrocitomas de alto grau e a Figura 29 (A-I) mostra a sobrevida dos pacientes acometidos por glioblastomas. A Figura 30 (A-I) mostra a sobrevida dos pacientes acometidos por meduloblastomas.

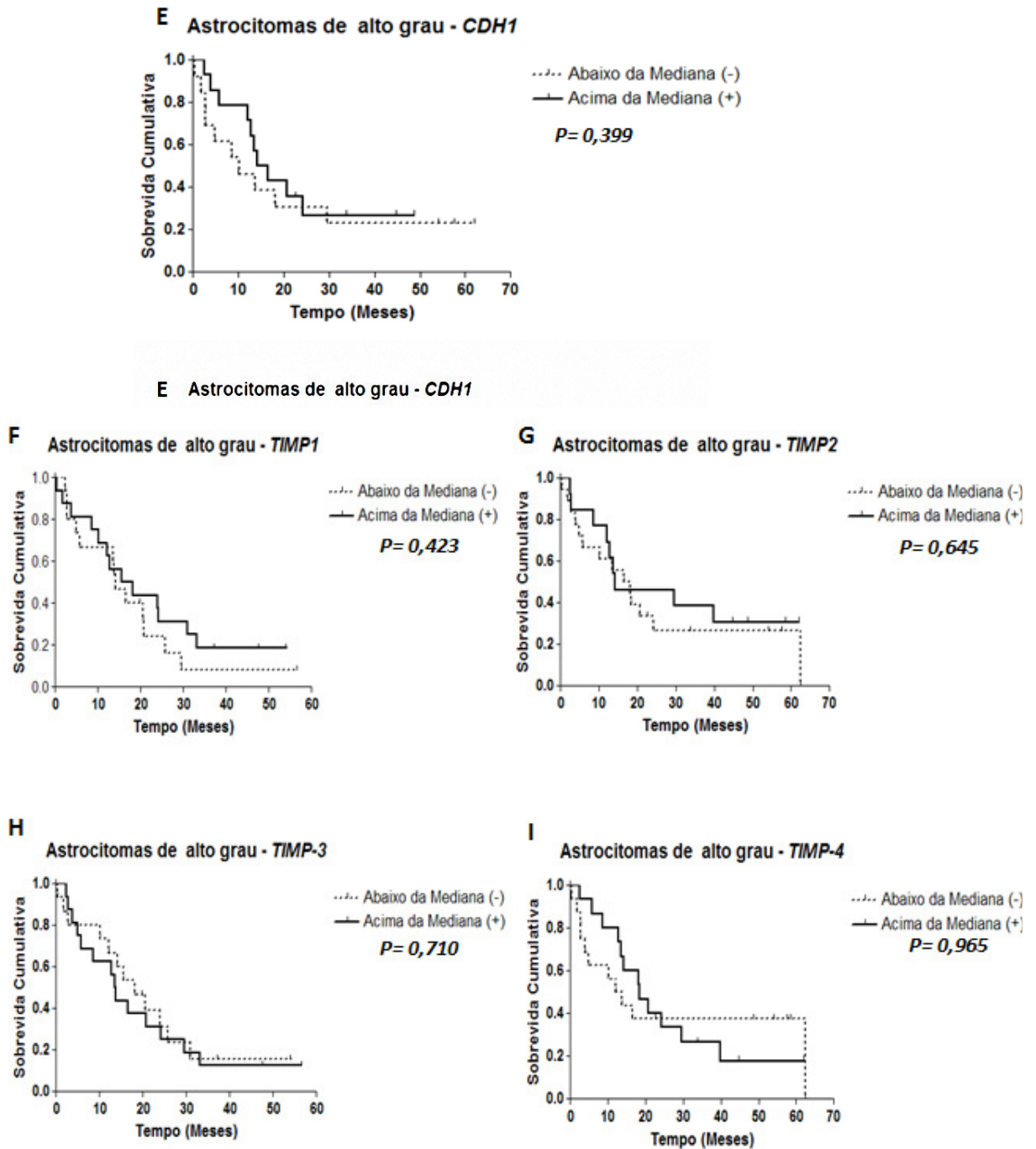
Não foram observadas diferenças significativas nas curvas de sobrevida dos pacientes acometidos por astrocitomas de alto grau e meduloblastomas. Entretanto, as análises de sobrevida envolvendo a curva de sobrevida do gene *MMP-9* nos glioblastomas revelou que os pacientes com expressão acima da mediana apresentaram sobrevida menor, em relação aos pacientes com expressão abaixo da mediana ( $P= 0,007$ ).

Esse dado foi submetido ao teste multivariado de Cox, onde se avaliou a independência desse evento em relação a outro importante fator prognóstico nos glioblastomas, a idade dos pacientes. Para essa análise esse grupos de pacientes foram ainda subdivididos em pacientes acima de 45 anos e abaixo de 45 anos. A análise multivariada revelou que a expressão aumentada de *MMP-9* é um fator independente da idade dos pacientes ( $P=0,013$ ), o que caracteriza a expressão de *MMP-9* como um importante fator prognóstico no estudo dos glioblastomas.

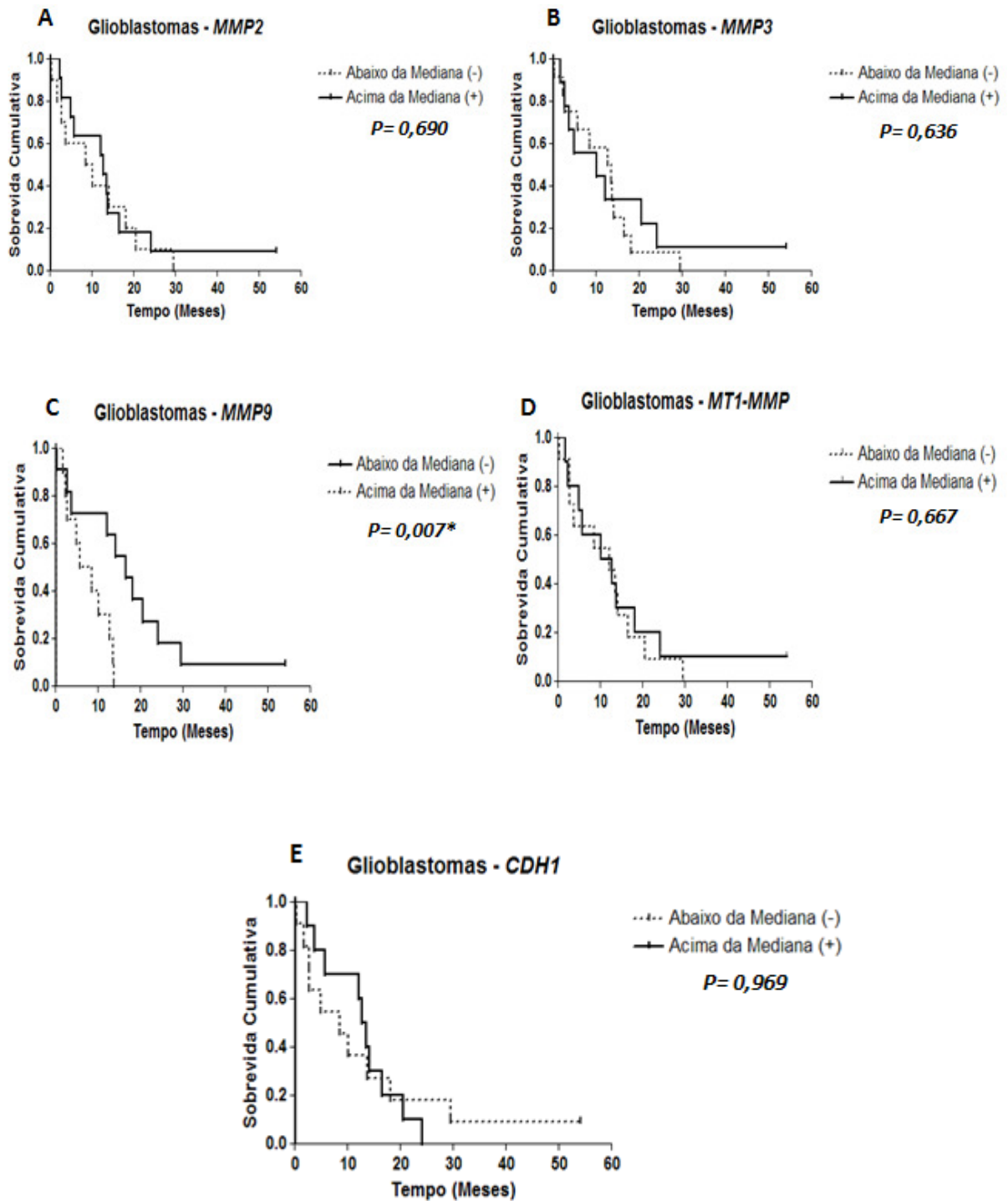


**Figura 28.** Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de  $P$  (teste log-rank) de pacientes acometidos por astrocitomas de alto grau para os genes de migração e adesão celular estudados. **Continua.....**

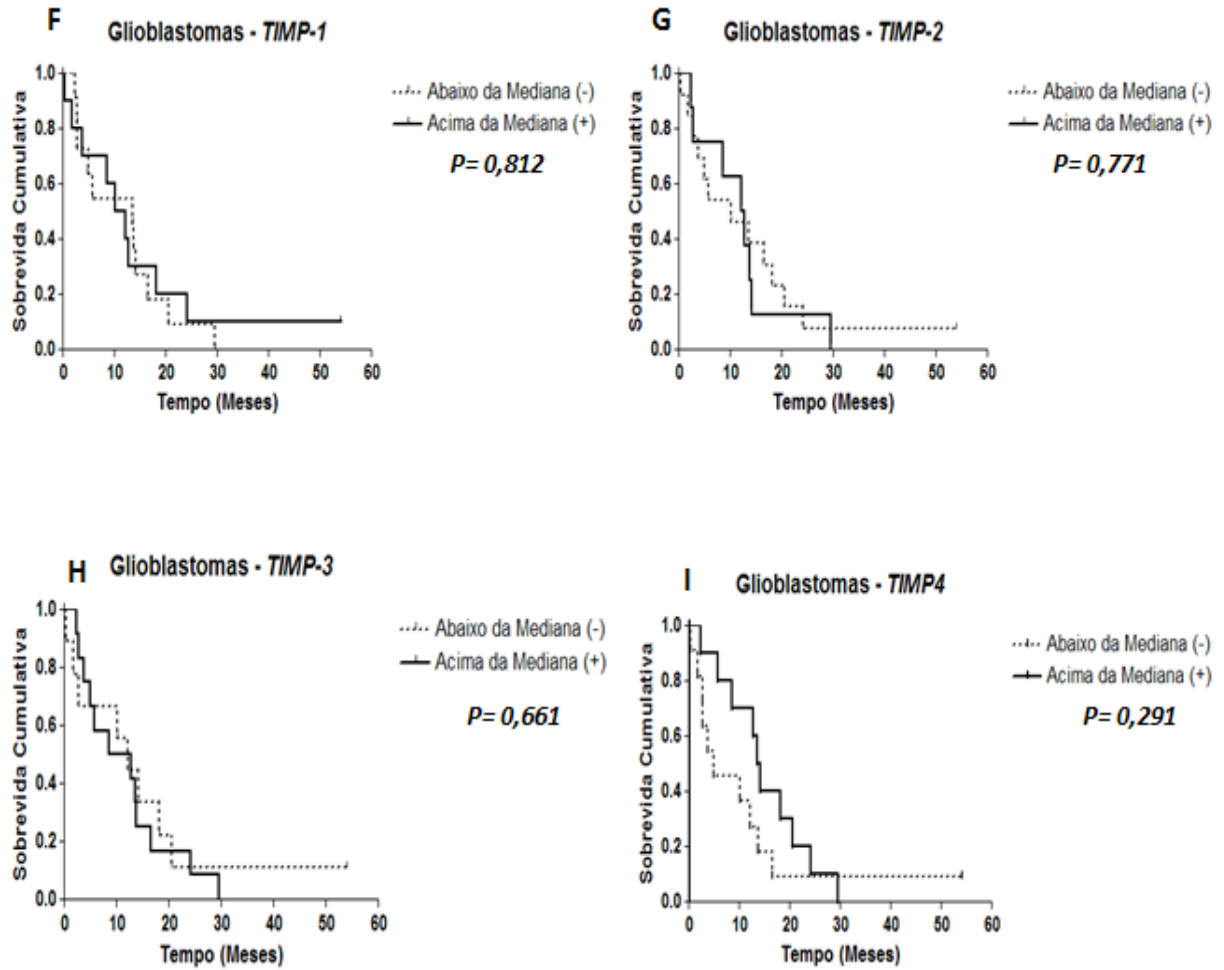




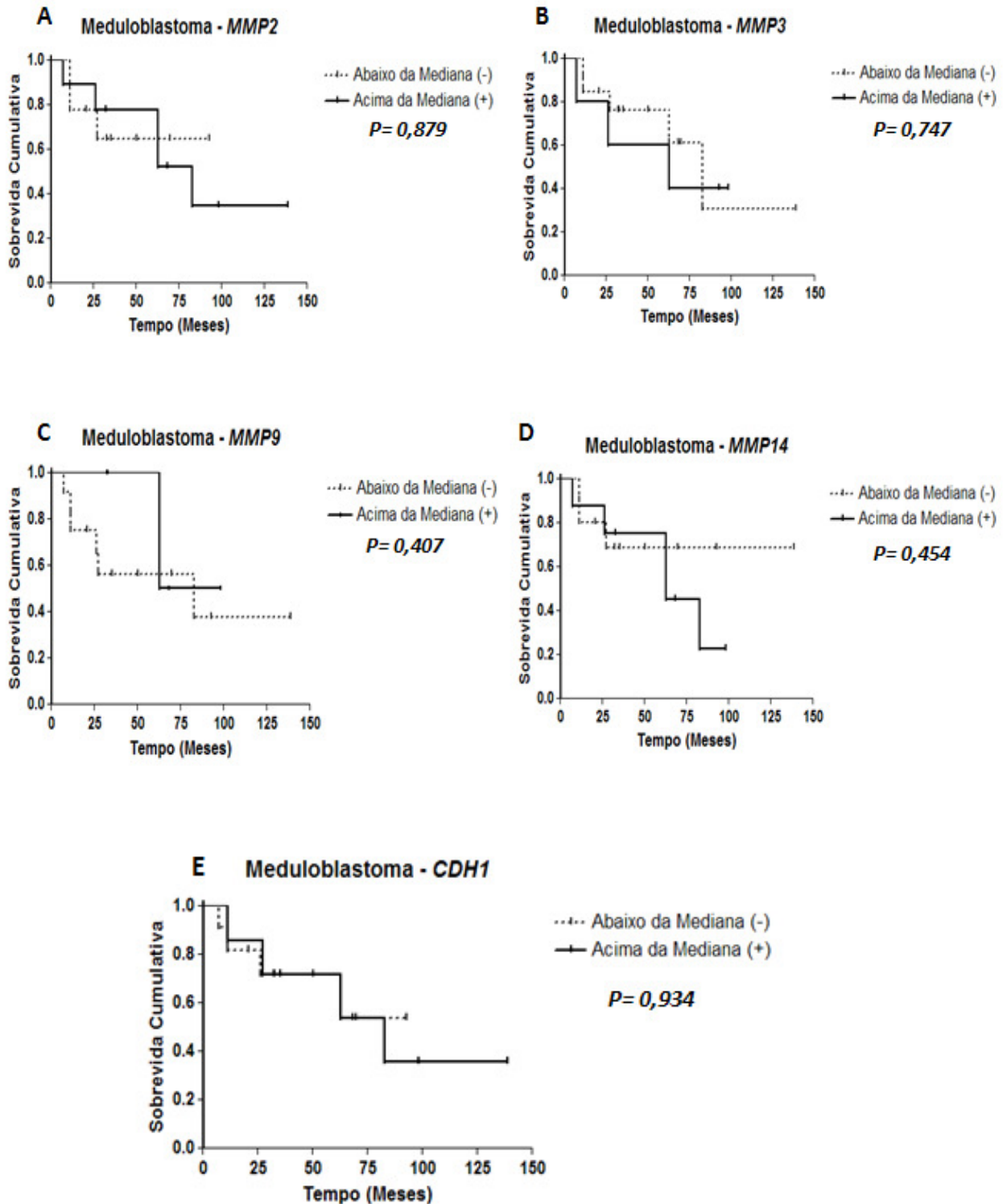
**Figura 28.** Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de  $P$  (teste log-rank) de pacientes acometidos por astrocitomas de alto grau para os genes de migração e adesão celular estudados. **Continuação**



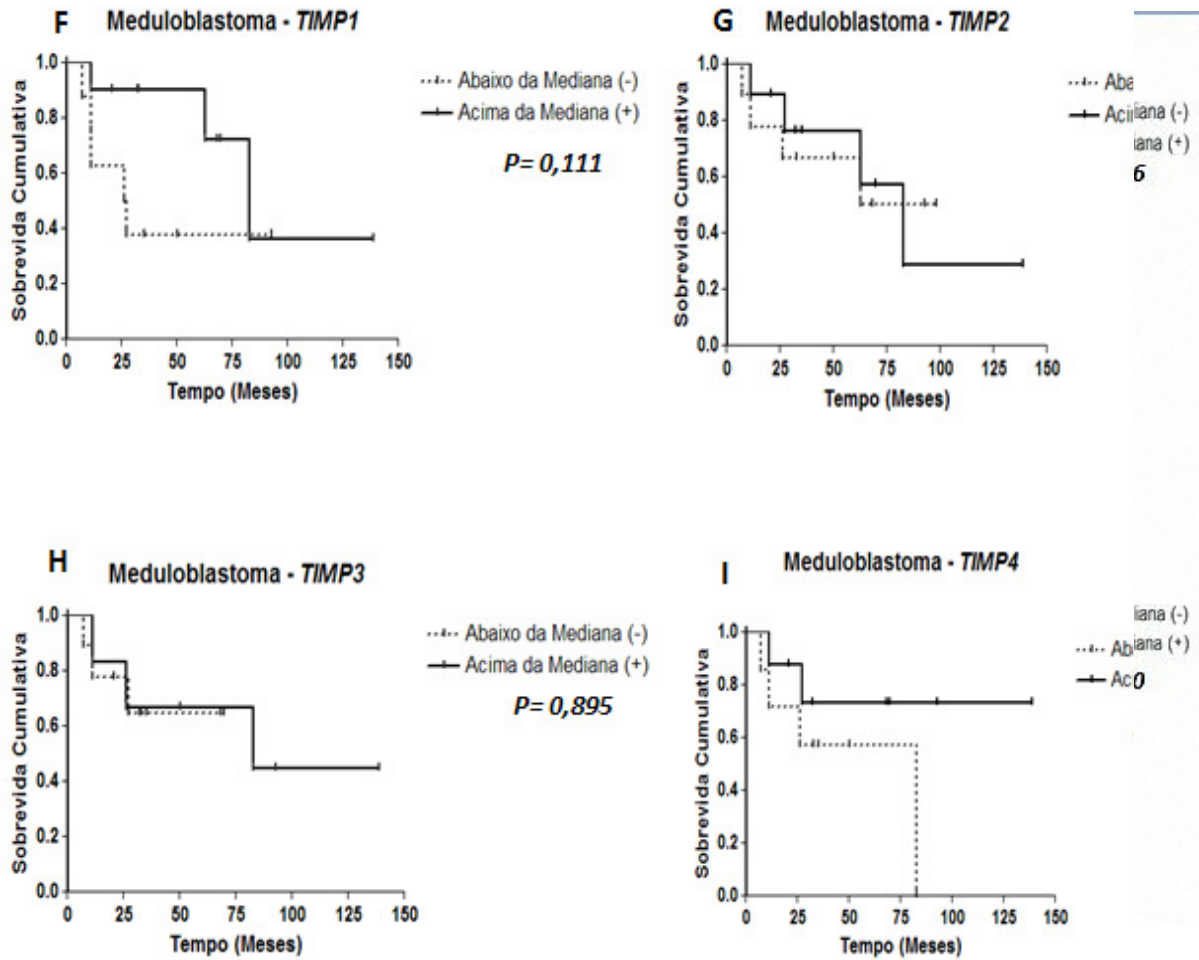
**Figura 29.** Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de  $P$  (teste log-rank) de pacientes acometidos por glioblastomas para os genes de migração e adesão celular estudados. **Continua....**



**Figura 29.** Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de  $P$  (teste log-rank) de pacientes acometidos por glioblastomas para os genes de migração e adesão celular estudados. **Continuação**



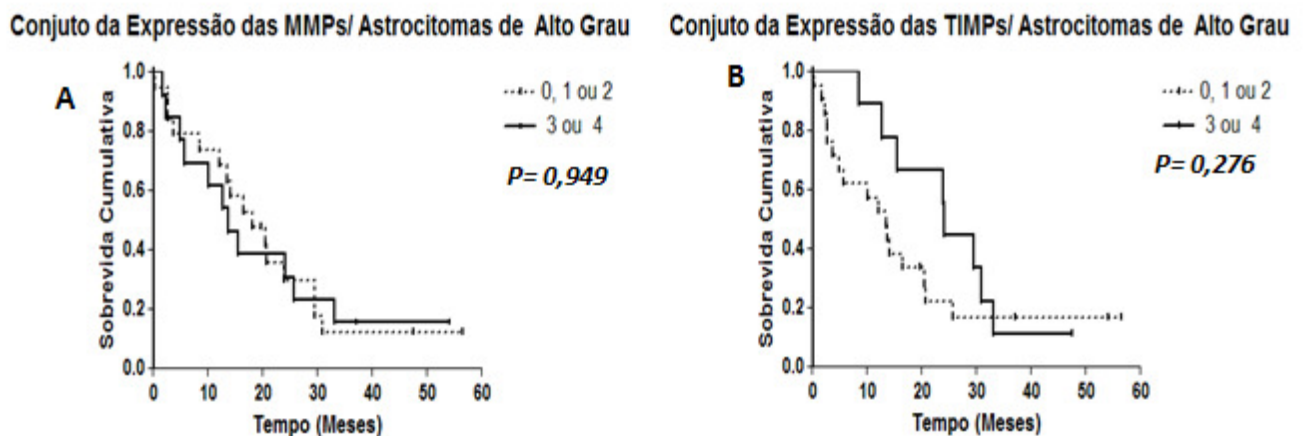
**Figura 30.** Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de  $P$  (teste log-rank) de pacientes acometidos por meduloblastoma para os genes de migração e adesão celular estudados. **Continua...**



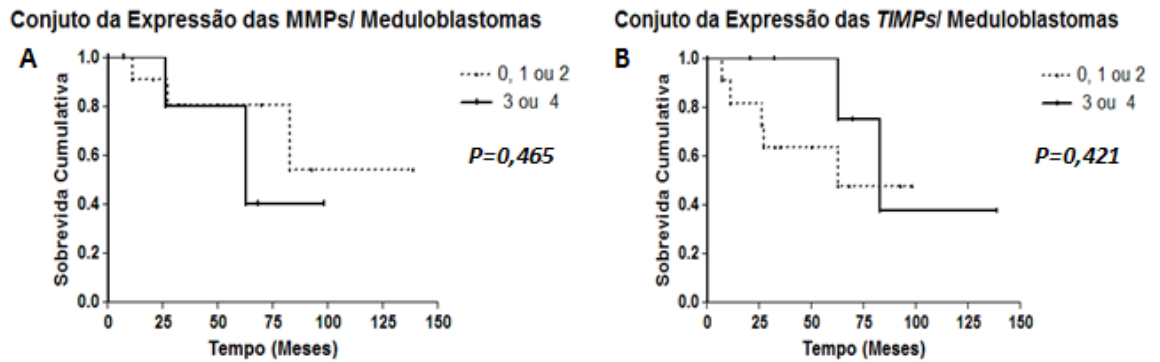
**Figura 30.** Curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e valores de  $P$  (teste log-rank) de pacientes acometidos por meduloblastoma para os genes de migração e adesão celular estudados. **Continuação**

Para avaliar a influência da expressão aumentada de vários dos genes MMPs e TIMPs em um mesmo paciente, e não apenas o aumento da expressão dos genes isoladamente, com a sobrevida global, foi avaliado o papel da expressão aumentada do conjunto de três ou mais dos genes das MMPs ou TIMPs hiperexpressos em um mesmo paciente *versus* pacientes com nenhum, um ou apenas dois dos genes das MMPs / TIMPs com expressão aumentada.

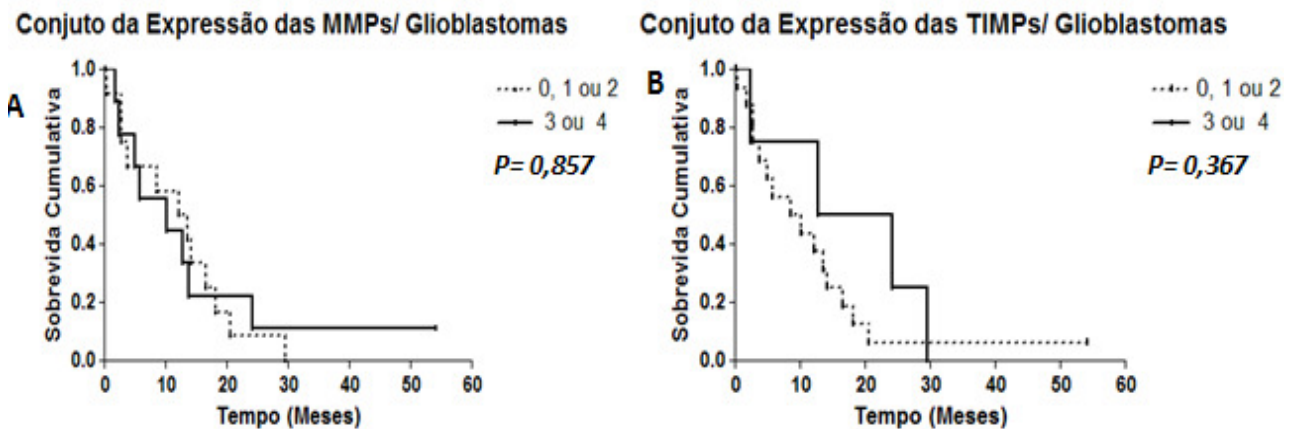
As curvas de sobrevida cumulativa e a comparação entre as sobrevidas para pacientes com os diagnósticos de astrocitomas de alto grau, glioblastomas e meduloblastomas estão demonstradas nas Figuras 31, 32 e 33, respectivamente. Não foi observada nenhuma influencia da expressão aumentada do conjunto de genes de adesão e migração celular na sobrevida global dos pacientes acometidos por tumores neuroepiteliais.



**Figura 31.** (A) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de MMPs nos Astrocitomas de Alto grau (graus III e IV). (B) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de TIMPs nos Astrocitomas de Alto grau (graus III e IV).



**Figura 32.** (A) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de MMPs nos Glioblastomas. (B) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de TIMPs nos Glioblastomas.



**Figura 33.** (A) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de MMPs nos Meduloblastomas. (B) Curva de sobrevida do conjunto da expressão de TIMPs nos Meduloblastomas.

## **5- DISCUSSÃO**

---



Desde a descoberta das MMPs em 1962 por Gross e Lapière essas enzimas têm despertado grande interesse nos pesquisadores pelo seu envolvimento em diversos eventos fisiológicos e patológicos. No entanto, apenas na década de 80 surgiram indícios do envolvimento das MMPs no desenvolvimento e na progressão das neoplasias (MATRISIAN *et al.*, 1986).

As propriedades invasivas dos tumores do SNC são de grande importância clínica, uma vez que estas contribuem para o comportamento agressivo desses tumores (RAO, 2003). Por razões ainda não muito bem esclarecidas a maioria dos tumores neuroepiteliais primários não evolui com metástases sistêmicas. No entanto, esses tumores invadem os tecidos circunvizinhos infiltrando suas células no tecido normal ou, mais raramente, estes tumores se disseminam ao longo do neuro-áxis pelo fluido cérebro-espinhal.

O mecanismo de invasão dos tumores neuroepiteliais é um processo complexo onde as células tumorais precisam se destacar da massa tumoral parental e se unir novamente a MEC. A este processo é associado um aumento na mobilidade celular e da capacidade das células tumorais de hidrolisar proteínas, proteoglicanos e carboidratos pertencentes a MEC. Essas células realizam esta tarefa através da produção excessiva de proteases que modificam a matriz extracelular, criando assim, um acesso para os tecidos vizinhos e que propicia a migração para outras partes do cérebro (LEVICAR *et al.*, 2003).

Dentre as proteases capazes de degradar a MEC do tecido cerebral, estão as MMPs. A integridade da matriz extracelular depende de um equilíbrio dinâmico entre as MMPs e TIMPs. A perda desse equilíbrio pode levar à criação de um ambiente permissivo à instalação e desenvolvimento de um processo neoplásico no tecido cerebral.

Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento das MMPs e TIMPs, bem como das moléculas de adesão celular, no desenvolvimento de neoplasias malignas do SNC (MOHANAM *et al.*, 1995; ROOPRAI *et al.*, 1998; FORSYTH *et al.*, 1999; NAKADA *et al.*, 2001).

As alterações de expressão desses genes parecem estar ligadas diretamente a capacidade invasiva das células tumorais. Classicamente, as MMPs são tidas como moléculas responsáveis pela promoção do crescimento tumoral, enquanto que as TIMPs, agiriam bloqueando a capacidade invasiva das neoplasias (DERYUGINA; QUINLEY, 2006)

O presente estudo avaliou o perfil de expressão dos genes relacionados com a migração e adesão celular (*MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*; *MT1-MMP*; *TIMP-1*; *TIMP-2*; *TIMP-3*; *TIMP-4* e *CDH1*) em uma série de tumores neuroepiteliais, onde observamos níveis de expressão distintos entre os tipos histológicos e graus de malignidade estudados.

Os astrocitomas de alto grau e meduloblastomas são tumores neuroepiteliais de diferentes origens celulares e altamente invasivos. A degradação da MEC é uma condição *sine qua non* para capacidade invasiva desses tumores. A comparação entre os tumores de origem glial, astrocitomas, e os tumores embrionários revelou que os genes *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3*, *TIMP-4* e *CDH1* são mais expressos nos tumores astrocíticos em relação aos tumores embrionários. Não foi observada diferença significativa na expressão dos genes *MMP-2* e *MMP-3* entre essas duas linhagens celulares. É válido ressaltar que a expressão de *MMP-2* é constitutiva e que não foi detectada expressão de *MMP-3* em muitas das amostras estudadas.

Nossas observações sugerem que os diferentes níveis de expressão dos genes supracitados, devem ser relacionados com as diferenças no comportamento clínico-biológico observadas entre astrocitomas e os meduloblastomas. Entretanto, esse dado deve ser analisado cuidadosamente visto a grande diferença no número amostral entre os tipos

celulares estudados que compreenderam 62 tumores astrocíticos contra 19 tumores embrionários. Essas diferenças nos níveis de expressão dos genes estudados tornaram-se muito mais informativas quando comparados os tipos histológicos e os graus de malignidade dos tumores do sistema nervoso central.

### 5.1 Gelatinases A (*MMP-2*) e Gelatinases B (*MMP-9*)

As gelatinases A (*MMP-2*) e B (*MMP-9*) são sem dúvida as metaloproteinases de matriz mais bem estudadas nos tumores do SNC, e têm sido identificadas como fatores importantes no desenvolvimento de gliomas de alto grau (PAGENSTECHER *et al.*, 2001; MUNAUT *et al.*, 2003; ZHAO, *et al.*, 2007).

Observamos que os tumores astrocíticos apresentaram maior expressão dos genes *MMP-2* e *MMP-9* quando comparados à substância branca estudada. Essa observação está diretamente ligada à própria natureza invasiva desses tumores, pois relatos na literatura apontam que os níveis de expressão dessas gelatinases são geralmente baixos no tecido cerebral normal (VAN METER *et al.*, 2001).

Os tumores astrocíticos de alto grau apresentaram níveis ligeiramente maiores de expressão do gene *MMP-2* quando comparados com os tumores de baixo grau, entretanto essa diferença não foi significativa, embora próximo do significativo ( $P=0,062$ ). Também não observamos nenhuma influência da expressão de *MMP-2* na sobrevida global dos pacientes acometidos pelos tumores estudados. Por outro lado, os dados obtidos por Jäälinojä *et al.* (2000), através de imunohistoquímica de 101 amostras de neoplasias do SNC, demonstraram que expressão elevada da proteína *MMP-2* é uma característica das neoplasias de alto grau de malignidade e está associada a baixa sobrevida desses pacientes. Dados semelhantes a

este também foram observados por Kunishio et al. (2003), que através de análises imunohistoquímicas, encontraram evidências de que *MMP-2* e não *MMP-9* é associado ao aumento da agressividade em tumores astrocíticos.

As análises de expressão do gene *MMP-9* revelaram que este gene é mais expresso nos tumores astrocíticos do que no tecido não tumoral. Essa expressão é muito mais acentuada nos tumores de mais alto grau de malignidade, sobretudo nos glioblastomas em comparação com os de baixo grau e aos meduloblastomas. Nosso estudo revelou ainda que, astrocitomas pilocíticos originados nas vias ópticas, hipotálamo e hipófise, sabidamente mais agressivos, apresentam níveis de expressão de *MMP-9* superiores quando comparados aos tumores originados nos hemisférios cerebrais. Estas observações sugerem que hiperexpressão de *MMP-9* é um dos principais mecanismos necessários ao aumento da capacidade invasiva e da agressividade dos tumores do SNC.

Nossos dados demonstraram ainda que, a hiperexpressão de *MMP-9* em pacientes acometidos por glioblastomas contribui significativamente para diminuição da sobrevida global. Análises multivariadas sugerem que a hiperexpressão de *MMP-9* seja um fator prognóstico independente de suma importância para manejo de pacientes acometidos por glioblastomas. Essas observações sustentam a hipótese de que alteração na expressão do gene *MMP-9* é determinante na agressividade nos tumores neuroepiteliais.

Komatsu et al. (2004) estudaram a expressão de *MMPs-2 e -9* em gliomas humanos com auxílio de duas técnicas distintas imunohistoquímica e RQ-PCR. As análises imunohistoquímicas não revelaram correlação da expressão da proteína *MMP-2* com o grau de malignidade. Entretanto, as análises quantitativas de mRNA demonstraram que os tumores de mais alto grau, como glioblastomas, apresentam níveis bem mais elevados dos genes *MMP-2 e MMP-9* quando comparados aos tumores de baixo grau. Esse estudo

demonstra claramente que diferenças metodológicas podem ser determinantes para os resultados conflitantes encontrados na literatura.

A elevação dos níveis de expressão de *MMP-2* e *MMP-9* e suas relações com os tumores neuroepiteliais de maior agressividade e maior capacidade de invasão também foram relatados por uma série de autores, dos quais se destacam os trabalhos de Lampert et al. (1998), Forsyth et al. (1999), Pagenstecher et al. (2001), Munaut et al. (2003) e Wang et al. (2003). Wild-bode et al. (2001) ressaltam ainda, que a expressão elevada de *MMP-2* e *MMP-9* são os melhores preditores da invasão das células de gliomas de alto grau.

Outra importante observação que evidencia a relevância prognóstica da elevação da expressão de *MMP-9* foi demonstrada por Hormigo et al. (2006) que detectaram a elevação da proteína *MMP-9* no soro de pacientes acometidos por gliomas de alto grau, o que não foi observado nos tumores de baixo grau e no tecido não neoplásico. Esses autores sugerem ainda que, *MMP-9* pode ser usado como um biomarcador importante no manejo dos pacientes acometidos por glioblastoma.

Os níveis de expressão dos genes *MMP-2* e *MMP-9* nos meduloblastomas estudados são semelhantes aos observados nos tumores astrocíticos de baixo grau de malignidade. Resultados semelhantes foram observados por Vince et al. (2001) que, através de imunohistoquímica e zimografia, verificaram níveis de expressão mais discretos dessas gelatinases nos meduloblastomas em comparação aos glioblastomas. Esses autores observaram ainda que a proteína *MMP-2* é mais comumente encontrada em área de intensa atividade proliferativa, enquanto que *MMP-9* está relacionada a sítios de angiogênese nos meduloblastomas. Ozen et al. (2004) observaram, também, maior imunoreatividade de *MMP-9* nas células endoteliais dos meduloblastomas em comparação com *MMP-2*.

A angiogênese é um processo onde novos vasos são formados a partir de células endoteliais de vasos adjacentes altamente dependentes da migração/invasão das células endoteliais para os tecidos. A MEC age seqüestrando/armazenando fatores promotores da angiogênese tais como VEGF, bFGF e TGF1, que são liberados durante a degradação proteolítica da MEC. Nesse sentido, as MMPs desempenham uma função crítica no processo de angiogênese. As MMPs contribuem tanto promovendo quanto inibindo a angiogênese (RUNDHAUG, 2005; JAIN *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2008).

As gelatinases parecem ser as principais promotoras da invasão das células endoteliais no SNC (LAKKA *et al.*, 2005). A MMP-2 é expressa constitutivamente pelas células endoteliais e interage com a trombina presente em níveis elevados em sítios angiogênicos, o que leva à ativação da proteína C na superfície do endotélio. A proteína C ativada interage com as MMP-2 latentes aumentando atividade protease, permitindo, assim, que as células endoteliais degradem a membrana basal. A MMP-9 ativada é então secretada pelas vesículas intracelulares das células endoteliais para potencializar a degradação da membrana basal. Quando a membrana basal atinge o interstício, a abundância de colágeno tipo I continua retroalimentando a ativação de MMP-2 por um período de maior tempo, consolidando assim o processo de angiogênese (NGUYEN *et al.*, 2001).

Os glioblastomas são tumores astrocíticos de maior comportamento invasivo. Essa propriedade está intimamente associada ao seu alto nível de vascularização. Estudos *in vivo* e *in vitro* relatam que *MMP-2* e *MMP-9* são hiperexpressos nas células endoteliais de glioblastomas (VINCE *et al.*, 2001). O envolvimento direto desses genes no processo de angiogênese pode ser a explicação para nossa observação de que, as maiores medianas de expressão de *MMP-2* e *MMP-9* são encontradas nos tumores de alto grau de malignidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Munaut *et al.* (2003) que observaram, ainda, que a hiperexpressão das *MMP-2* e *MMP-9* é correlacionada com hiperexpressão do fator de

crescimento vascular endotelial (VEGF) nos glioblastomas, um dos principais mediadores da angiogênese.

Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a influência de polimorfismos na expressão dos genes *MMP-2* e *MMP-9* em tumores neuroepiteliais. Elevação na expressão de *MMP-2* e *MMP-9* e suas implicações clínico-biológicas em outros tumores são relatadas em uma série de estudos na literatura. Cho et al. (2007) relataram que hiperexpressão de *MMP-9* é relacionada ao mau prognóstico nos tumores colorretais. Observações semelhantes foram obtidas por Kawata et al. (2007) em tumores renais e por Iniesta et al. (2007) nos tumores de pulmão de células não pequenas. Nossas observações são sugestivas de que a elevação da expressão de *MMP-2* e *MMP-9* aumentam a capacidade invasiva dos tumores neuroepiteliais, fazendo dessas moléculas potenciais alvos no combate a essas neoplasias.

## **5.2 Estromalisina-1 (*MMP-3*)**

A análise de expressão dos níveis de mRNA de *MMP-3* nas amostras pesquisadas revelou que essa MMP é a menos expressa nos tumores neuroepiteliais, bem como, nas amostras de tecido não neoplásico. É relevante mencionar que 53 (65,43%) das amostras estudadas não apresentaram níveis de expressão de *MMP-3* detectáveis. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de expressão desse gene entre os tumores astrocíticos de baixo e alto grau, o que pode ser reflexo direto da quantidade elevada de amostras sem expressão desse gene. É importante ressaltar que não encontramos na literatura nenhum relato da análise de expressão deste gene nos tumores neuroepiteliais pela técnica de RQ-PCR.

A literatura acerca da expressão de *MMP-3* nos tumores do SNC é escassa e apresenta resultados conflitantes. Dados semelhantes aos nossos foram obtidos por Lampert et al. (1998), usando as técnicas de *Northern blot* e imunoquímica, os quais, observaram que a expressão de *MMP-3* é muito fraca nos tumores neuroepiteliais e não demonstram qualquer relação da expressão desse gene com os graus de malignidade e tipo histológico dos tumores estudados. Vince et al. (1999) estudaram a expressão de *MMP-3* em uma série de glioblastomas, através de técnicas de RT-PCR e imunohistoquímica, e não encontraram expressão da proteína *MMP-3* em nenhuma das 56 amostras estudadas. Entretanto, as observações de Bodey et al. (2000) evidenciaram elevados níveis de imunoreatividade da proteína *MMP-3* em tumores astrocíticos de baixo grau, principalmente em regiões da MEC localizadas próximas a vasos sanguíneos.

Dados de *Western blot* e zimografia obtidos por Mercapide et al. (2003) revelaram que a expressão de *MMP-3* é significativa em culturas de células derivadas de astrocitomas e que essa proteína é diretamente envolvida no aumento da capacidade invasiva dessas células.

Cheng et al. (2007) também descreveram que a elevação da expressão de *MMP-3* em linhagens derivadas de gliomas humanos (*T98G*) aumentam significativamente a capacidade de migração e invasão dessa linhagem. Entretanto, Vince et al. (1999) relatam que, embora a *MMP-3* se apresente em quantidades significativas em culturas celulares derivadas de gliomas, essa proteína parece não influenciar diretamente a capacidade invasiva dos glioblastomas *in vivo*.

As maiores medianas de expressão desse gene foram observadas nos Astrocitomas anaplásicos (grau III). Esse resultado pode ser relacionado à capacidade de *MMP-3* de degradar o colágeno tipo IV, um dos principais constituintes da membrana basal dos vasos



sangüíneos cerebrais, além da ativação de pró-MMP-9 importante mediador da angiogênese, visto que este tumor também apresenta um nível de vascularização considerável.

Não foram encontrados na literatura relatos acerca do envolvimento direto de *MMP-3* e a vascularização nos tumores neuroepiteliais. Entretanto, há relatos indicando que a elevação da expressão de *MMP-3* apresenta uma função crítica na migração celular, invasão e angiogênese tanto em neoplasias quanto em outros processos patológicos (VIHINEN *et al.*, 2002; RAÏF, 2008).

Não observamos relação entre a hiperexpressão de *MMP-3* nos tumores neuroepiteliais e a sobrevida global dos pacientes estudados. Por outro lado, há relatos na literatura de que a expressão elevada de *MMP-3* implica na redução da sobrevida global de pacientes acometidos por tumores colorretais (ZINZINDOHOUE *et al.*, 2005) e de bexiga (NAKOPOULOU *et al.*, 2001).

Em vista desses resultados, novos estudos envolvendo a expressão de *MMP-3* seriam de grande importância para elucidar o papel dessa MMP nos fatores que promovem a agressividade (progressão, invasão e angiogênese) nos tumores neuroepiteliais.

### **5.3 MMP-14 (MT1-MMP)**

MT1-MMP é considerada uma molécula promotora da invasão das células tumorais e facilitadora de metástases. Essa MMP propicia que tanto as células normais quanto as células neoplásicas adquiram capacidade invasiva, através de sua propriedade de degradar o colágeno pericelular, facilitando também angiogênese através da ativação de células endoteliais. Essa atividade foi documentada tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro* (MARTIN;

MATRISIAN, 2007). A atividade pró-invasiva de MT1-MMP foi relacionada com progressão e invasão de alguns tumores tais como: os cervicais por Zhai et al. (2005) e em tumores neuroepiteliais nos estudos de Forsyth et al. (1999); Nakada et al. (1999; 2001); Ozen et al. (2004) e Kong et al. (2007).

Nosso estudo revelou que o gene *MT1-MMP* é mais expresso nos tumores do que nas amostras de substância branca usadas como controle. Além disso, dentre os tumores neuroepiteliais estudados a maior mediana de expressão foi encontrada nos glioblastomas. Nossos dados são compatíveis com os relatos na literatura sobre o envolvimento de *MT1-MMP* na progressão maligna dos tumores neuroepiteliais como os observados por Lampert et al. (1998), Forsyth et al. (1999), Pagenstecher et al. (1999), Nakada et al. (1999; 2001) e Guo et al. (2005).

Dentre os estudos que observaram relações diretas entre o aumento da expressão de *MT1-MMP* e a evolução dos tumores neuroepiteliais destaca-se o de Nuttall et al. (2003), onde esses autores observaram um aumento de mais de 21 vezes do nível de mRNA nos glioblastomas em relação ao tecido cerebral não tumoral. A hiperexpressão dessa MMP também é relatada em linhagens celulares de glioblastoma (*U251*), a mais invasiva das linhagens testadas por esses autores. Essa elevação nos níveis de *MT1-MMP* foi acompanhada pela hiperexpressão das *MMP-2* e *MMP-9* além de genes relacionados com a angiogênese como o *VEGF*. Munaut et al. (2003) também relataram que a expressão acentuada de *VEGF* é acompanhada pela hiperexpressão de *MMP-2*, *-9* e *MT1-MMP*, onde essas gelatinases atuam de maneira sinérgica na criação de um ambiente permissivo para invasão das células dos glioblastomas.

Observamos ainda que os astrocitomas pilocíticos apresentaram medianas de expressão de *MT1-MMP* próximos aos detectados nos astrocitomas de alto grau (Grau III e IV). Pagenstecher et al. (1999) também observaram níveis de expressão dessa MMP nos

astrocitomas pilocíticos compatíveis aos observados nos astrocitomas anaplásicos e glioblastomas.

Os relatos de Arroyo et al. (2007) e de Basile et al. (2007) demonstram que *MT1-MMP* desempenha um papel crucial no processo de angiogênese e que este gene geralmente encontra-se hiperexpresso em sítios de neoangiogênese. Acreditamos que nossas observações são relacionadas ao nível de vascularização desses tumores, visto que, assim como os astrocitomas de alto grau, os astrocitomas pilocíticos apresentam um nível de vascularização significativo. A hiperexpressão de *MT1-MMP* e suas relações com comportamento agressivo dos tumores também foram descritas em câncer de partes moles por Roebuck et al. (2005) e mais recentemente, por Sroka et al. (2008) em tumores de próstata.

Não encontramos na literatura relatos referente à análise de sobrevida de pacientes acometidos por tumores neuroepiteliais e os dados de expressão de *MT1-MMP* são escassos. Não observamos relações entre o nível de expressão desta MMP e o impacto na sobrevida dos pacientes estudados. Resultado semelhante foi observado por Ozen et al. (2004) que estudaram a expressão da proteína MT1-MMP em meduloblastomas. Entretanto, hiperexpressão dessa protease foi relacionada à baixa sobrevida em pacientes acometidos por tumores de mama e ovarianos (KAMAT *et al.*, 2006; TÊTU *et al.*, 2006). Nossos dados sugerem que o aumento da expressão de *MT1-MMP* contribui de maneira significativa na progressão dos tumores do SNC podendo ser um possível alvo de terapia no combate dessas neoplasias neuroepiteliais.

#### 5.4 TIMP-1

A TIMP-1 está envolvida em uma série de processos biológicos e patológicos, que incluem: atividade promotora do crescimento, inibição da angiogênese e mudanças na morfologia celular. No SNC essa molécula parece possuir uma ação neuroprotetora na manutenção da barreira hemato-encefálica, por sua inerente ação inibitória das MMPs. TIMP-1 também apresenta uma característica peculiar de não ter capacidade de inibir a MT1-MMP, ao contrário do que é observado nas outras TIMPs (DUFFY *et al.*, 2008).

O envolvimento de *TIMP-1* no desenvolvimento dos tumores neuroepiteliais foi relatado por uma série de estudos (KAKAGAWA *et al.*, 1994; LAMPERT *et al.*, 1998; PAGENTECHER *et al.*, 1999; GADNER; GHORPADE, 2003). Nossos resultados revelaram que este gene é preferencialmente expresso nos tumores estudados em relação à substância branca não neoplásica. Observamos ainda que, a expressão de *TIMP-1* nos tumores de alto grau não difere estatisticamente dos tumores astrocíticos de baixo grau de malignidade. Esse resultado deve ser em consequência dos níveis de expressão de *TIMP-1* nos glioblastomas ser próximos aos observados nos astrocitomas pilocíticos.

Observações contrária as nossas foram previamente relatadas por Mohanam *et al.* (1995), utilizando a técnica de *Northern Blot*, os quais observaram que *TIMP-1* é mais expressa nos tecidos normais e nos tumores de baixo grau em relação aos tumores de alto grau de malignidade estudados.

*A priori* os altos níveis de expressão *TIMP-1* encontrados nos glioblastomas podem parecer contraditórios, em função da atividade antitumoral das TIMPs. Entretanto, na literatura são encontrados relatos de que a elevação no nível de expressão das TIMPs pode ocorrer em duas situações distintas: (1) como consequência do mecanismo de defesa do tecido hospedeiro frente à invasão e (2) pela atividade direta ou indireta das TIMPs em promoverem o crescimento celular, atividade da qual a massa tumoral faz uso para progredir

e invadir estruturas adjacentes (BRAND, 2002). Essa última propriedade age diretamente na evolução dessas neoplasias para os tumores de mais alto grau de malignidade.

A elevação da expressão de *TIMP-1* nos glioblastomas deve, também, servir para contrabalancear o aumento simultâneo da expressão de *MMP-9*, uma vez que *TIMP-1* inibe/ativa preferencialmente essa gelatinase. Dados semelhantes aos nossos foram obtidos por Pagentecher et al. (1999) e Huang et al (2005) que também detectaram níveis de expressão de *TIMP-1* semelhantes em astrocitomas pilocíticos e glioblastomas. Os resultados de Pagentecher et al. (1999) demonstraram ainda, que essa hiperexpressão é ligada aos sítios de neoangiogênese. Por causa de sua atividade promotora do crescimento *TIMP-1* pode contribuir para o aumento da malignidade dos tumores neuroepiteliais como relatado por Lampert et al. (1998) e Kachra et al. (1999).

Groft et al. (2001) demonstram que a hiperexpressão de *TIMP-1* é relacionada com malignidade dos gliomas. Os ensaios de localização da proteína realizados por Groft et al. (2001) demonstraram ainda, que *TIMP-1* é detectada preferencialmente próximo a sítios de formação de vasos sanguíneos. Ozen et al. (2004) observaram que apenas os meduloblastomas do tipo clássico expressam a proteína *TIMP-1*, que é localizada preferencialmente junto aos sítios de angiogênese. Essas observações devem ser consequência das interações com pró-*MMP-9* e sua capacidade promotora da angiogênese dessa *MMP*. Nossas observações parecem estar em consonância com esses relatos, uma vez que os tumores que apresentaram os maiores níveis de expressão possuem vascularização significativa.

Em nosso estudo não encontramos relações entre a expressão de *TIMP-1* e impacto na sobrevida dos pacientes estudados. Não encontramos na literatura nenhum trabalho sobre a expressão desse gene e sobrevida de pacientes acometidos por tumores neuroepiteliais. Entretanto, considerando outras neoplasias, relatos da literatura apontam que a

hiperexpressão de *TIMP-1* parece ser um fator prognóstico importante para pacientes acometidos por câncer de mama, visto que os pacientes com maiores níveis de expressão desse gene possuem maiores taxas de sobrevida (Nakopoulou *et al.*, 2003).

Nossos resultados não elucidam o papel da expressão de *TIMP-1* durante a evolução dos tumores neuroepiteliais e geraram ainda mais perguntas. Neste sentido, mais estudos devem ser realizados para tornar compressível o papel desse inibidor de metaloproteinase no comportamento clínico-biológico dos tumores do SNC.

### 5.5 *TIMP-2*

*TIMP-2* inibe preferencialmente a *MMP-2*, bem como, ativa as pró-*MMP-2* através da formação de complexos com *MT1-MMP*. Nossos dados demonstraram que há uma inversão do padrão de expressão desses genes nas amostras estudadas.

As maiores medianas de expressão *MMP-2* e *MT1-MMP* são encontradas nos tumores astrocíticos de alto grau, enquanto que, níveis significativamente maiores de expressão de *TIMP-2* são observados nos tumores astrocíticos de baixo grau de malignidade. Níveis elevados da expressão desse gene também são observados nas amostras de substância branca, usadas como contraparte normal, no entanto a comparação entre os tumores de baixo grau e as amostras de substância branca não apresentaram significância estatística ( $P > 0,05$ ). Esse resultado pode ser relacionado aos efeitos antagônicos clássicos desses genes no comportamento biológico dos tumores astrocíticos, onde as *MMPs* atuam como promotoras da invasão e as *TIMPs* como bloqueadoras do crescimento tumoral.

Resultados que apóiam nossas observações foram relatados por Mohanam *et al.* (1995), Kachra *et al.* (1999), Béliveau *et al.* (1999), Nakada *et al.* (2001) e Huang *et al.* (2005).

Esses autores também encontraram uma correlação inversa entre os níveis de expressão de *TIMP-2* e os graus de malignidade dos tumores do SNC. Lampert et al. (1998), Pagenstecher et al. (2001) e Nuttal et al. (2003) também detectaram altos níveis de expressão da proteína *TIMP-2* e de mRNA de *TIMP-2* em amostras de tecido cerebral não neoplásico entretanto diferente do observado em nosso estudo, esses autores não observaram correlações entre expressão de *TIMP-2* e os graus de malignidade. Os efeitos protetores da expressão de *TIMP-2* também foram demonstrados *in vitro* por Papi et al. (2007) em ensaios envolvendo células derivadas de gliomas.

Por outro lado, Saxena et al. (1999) encontraram correlação positiva entre os níveis de expressão *TIMP-2* e *MMP-2* e o nível de malignidade dos tumores do SNC, onde os níveis mais acentuados de expressão desses genes são principalmente encontrados nos tumores recorrentes. Possivelmente, o aumento da expressão de *TIMP-2* nesses tumores deve ser relacionado ao combate a invasão tumoral, mais precisamente à tentativa de bloqueio da atividade proteolítica de *MMP-2*, que facilita a invasão tumoral.

Nossos dados revelaram ainda que *TIMP-2* é menos expressa nos meduloblastomas em relação às demais amostras avaliadas. Estudos envolvendo essa *TIMP* e meduloblastomas são escassos, dentre os quais se destaca o estudo desenvolvido por Ozen et al. (2004) que demonstraram que a proteína *TIMP-2* é preferencialmente expressa nos meduloblastomas do tipo desmoplásico em relação ao meduloblastoma do tipo clássico e que os altos níveis de *TIMP-2* observados parecem ser fortemente associados ao aumento da expressão de *MMP-9* e *MT1-MMP* neste tumores. Nosso estudo não nos permite fazer comparações semelhantes, visto que os subtipos de meduloblastomas não foram avaliados separadamente.

Não encontramos em nosso estudo associações entre os níveis de expressão de *TIMP-2* e o impacto na sobrevida dos pacientes acometidos por tumores do SNC. Dados relativos a esta abordagem nos tumores do SNC também não foram encontrados na literatura. Por outro

lado, Curran et al. (2004) observaram que a perda da expressão de *TIMP-2* contribui de maneira significativa para a baixa taxa de sobrevivência de pacientes acometidos por tumores colorretais. Nossas observações, juntamente com os dados comumente encontrados na literatura, apontam que níveis mais elevados de expressão desse gene parecem estar associados ao comportamento menos agressivo nos tumores do SNC. Entretanto, mais estudos devem ser desenvolvidos para elucidar melhor o papel dessa *TIMP* nos tumores neuroepiteliais, principalmente nos meduloblastomas.

### 5.6 *TIMP-3*

Estudos têm demonstrado que a perda da expressão de *TIMP-3* é relacionada ao desenvolvimento de neoplasias e que o tecido cerebral normal apresenta níveis elevados de *TIMP-3*. Esse inibidor fisiológico das MMPs antagoniza a atividade de grande parte das metaloproteinases, levando assim, a supressão do crescimento tumoral, inibição da angiogênese, da invasão e da formação de metástases. A hiperexpressão deste gene nas células tumorais parece levá-las à apoptose, bem como, suprimir o crescimento tumoral precocemente (HOE *et al.*, 2007).

Os níveis de expressão desse gene apresentaram comportamento semelhante ao previamente relatado em *TIMP-2*. Os níveis mais elevados de expressão de *TIMP-3* foram observados nos tumores astrocíticos de baixo grau de malignidade, em comparação, aos astrocitomas de alto grau e aos meduloblastomas. No entanto, diferentemente do observado no comportamento da expressão de *TIMP-2* nas amostras estudadas, o tecido não neoplásico não apresentou níveis significantes de expressão de *TIMP-3*. Essa observação deve ser efeito



da expressão induzida desse gene por fatores externos como, por exemplo, proteólise da MEC requerida na tumorigênese.

Dados semelhantes aos nossos foram obtidos por Rickman et al. (2001); Huang et al. (2003) e Bozinov et al. (2008) através de análises de *microarray*, os quais observaram que *TIMP-3* é um dos genes preferencialmente expressos nos tumores do SNC de mais baixo grau de malignidade. Huang et al. (2003) ainda observaram que os tecidos não neoplásicos apresentam baixos níveis de expressão de *TIMP-3*. Por outro lado, Lampert et al. (1998) e Pangestecher et al. (1999) não encontram variação nos níveis de expressão desse gene entre os tumores estudados e sugerem ainda, que essa observação é compatível com tipo expressão constitutiva.

O efeito protetor dessa TIMP na proteção contra a capacidade invasiva das células de gliomas foi demonstrado por Lamfers et al. (2005), que utilizaram adenovirus para transferir o gene *TIMP-3* para culturas de células, o que resultou na elevação da expressão desse gene e redução da capacidade invasiva dessas células.

Relatos na literatura apontam que a principal causa da diminuição da expressão de *TIMP-3* é a hipermetilação de sua região promotora. Resultados obtidos por Gonzalez-Gomez et al. (2003a) e Gonzalez-Gomez et al. (2003b) revelaram que a região promotora desse gene encontra-se hipermetilada em glioblastomas, principalmente nos glioblastomas secundários, assim como nos meduloblastomas. Nakamura et al. (2005) observaram ainda, que, a perda de heterozigosidade da região 22q12.3, região que contém o gene *TIMP-3*, é um evento freqüente nos glioblastomas. Esses autores sugerem ainda que, essas alterações moleculares podem ser a principal causa da diminuição da expressão de *TIMP-3* nos tumores astrocíticos de alto grau.

Nossos dados demonstraram que os meduloblastomas possuem os menores níveis de expressão de *TIMP-3*. A hipermetilação de *TIMP-3* parece ser um evento freqüente em

meduloblastomas conforme relatado por Ebinger et al. (2004) e Mühlisch et al. (2007). Esse dado pode ser uma possível explicação do porquê desses tumores apresentarem baixos níveis de expressão desse gene. Ozen et al. (2004) demonstraram que os meduloblastomas expressam a proteína TIMP-3 e que essa expressão é mais intensa nos meduloblastomas do tipo desmoplásico, em comparação ao observado nos meduloblastomas do tipo clássico, o que pode ser reflexo dos diferentes eventos moleculares envolvidos no surgimento dessas entidades histológicas distintas.

Não encontramos nenhuma correlação entre os níveis de expressão desse gene e impacto na sobrevida dos pacientes estudados. Entretanto, Nakamura et al. (2005) demonstraram que a hipermetilação de *TIMP-3*, e conseqüentemente a redução da expressão desse gene, é um fator importante para baixa sobrevida dos pacientes acometidos por tumores de alto grau de malignidade. Correlações entre os baixos níveis de expressão desse gene e baixa taxa de sobrevida também foram observadas em câncer colorretal (HILSKA *et al.*, 2007), em câncer de pulmão de células não pequenas (MINO *et al.*, 2007) e em carcinomas de bexiga (HOQUE *et al.*, 2008). Nossos dados juntamente com os dados da literatura sugerem que *TIMP-3* é importante alvo para o combate da capacidade invasiva das neoplasias do SNC.

### **5.7 *TIMP-4***

Greene et al. (1996) identificaram uma *EST* (*Expressed sequence Tag*) com uma homologia significativa com as demais TIMPs. Essa *EST* foi identificada e clonada em bibliotecas de cDNA de coração de humanos. Esses autores identificaram baixos níveis desse

transcrito em uma série de tecidos e órgãos como rins e placenta e não identificaram expressão desse gene em tecidos derivados do cérebro, pulmão, timo e fígado. Esses autores sugerem que a contribuição de *TIMP-4* na manutenção da homeostase da MEC é tecido específico. Bigg et al. (1997) demonstraram ainda, que *TIMP-4* apresenta uma intensa afinidade pela pró-MMP-2 e, juntamente com a *TIMP-2*, participa do processo de ativação dessa pró-gelatinase A.

Verificamos em nosso estudo que as amostras de tecido não neoplásico apresentaram as menores medianas de expressão de *TIMP-4*. Níveis significativamente maiores de expressão desse gene foram encontrados nas amostras de astrocitomas de baixo grau de malignidade, quando comparados aos tumores astrocíticos de alto grau. Esses dados sugerem que existe uma correlação inversa entre a expressão de *TIMP-4* e os graus de malignidade dos tumores neuroepiteliais.

Os meduloblastomas foram os tumores que apresentaram os menores níveis de expressão de *TIMP-4*. Essa observação pode estar diretamente relacionada ao comportamento invasivo desses tumores. É válido ressaltar que não encontramos na literatura nenhum estudo que envolvesse a expressão desse gene e o comportamento biológico desses tumores.

A literatura a cerca do envolvimento de *TIMP-4* no desenvolvimento e progressão dos tumores do SNC é escassa. Nossos dados são semelhantes aos previamente relatados por Groft et al. (2001) que identificaram uma relação inversa entre os níveis de expressão de *TIMP-4* e malignidade dos tumores do SNC. Dados de *microarray* obtidos por Rorive et al. (2006) também demonstraram que *TIMP-4* é preferencialmente expresso nos astrocitomas pilocíticos em relação ao cérebro normal, aos astrocitomas grau II e astrocitomas de alto grau de malignidade (graus III e IV).

A elevação da expressão de *TIMP-4* em amostras de mais baixo potencial invasivo em relação aos tumores mais agressivos não é exclusividade dos tumores do SNC. Dados

semelhantes também foram observados em estudos envolvendo células derivadas de tumores de mama (WANG *et al.*, 1997); tumores de próstata (LEE *et al.*, 2006) e tumores retais (HILSKA *et al.*, 2007), onde os autores também observaram que os pacientes que apresentaram os maiores níveis de expressão de *TIMP-4* apresentaram sobrevida maior. Entretanto, nossos dados não revelaram qualquer relação entre expressão de *TIMP-4* e o impacto na sobrevida dos pacientes estudados.

Acredita-se que suposta proteção conferida pela hiperexpressão de *TIMP-4* esteja diretamente relacionada à capacidade que essa molécula possui de promover a apoptose das células tumorais (GUO *et al.*, 2004).

As propriedades inibidoras de proteases, inerentes às TIMPs podem ser exploradas para se alcançar benefícios terapêuticos em diversas patologias. O papel desempenhado pelo balanço MMPs e TIMPs em bloquear ou mesmo reverter a progressão tumoral tem levado ao desenvolvimento de inibidores sintéticos de MMPs (ISMP). Os ensaios clínicos com ISMP como: *marimastat* e *batimastat* no combate a neoplasias têm demonstrado resultados não muito animadores, como ineficiência em neoplasias avançadas e alguns efeitos colaterais (BAKER *et al.*, 2002).

Entretanto, os resultados observados em modelos animais demonstraram que o uso de ISMP preveniu o crescimento tumoral e a vascularização de tumores pré-malignos (BERGERS *et al.*, 1999; MUCHA *et al.*, 2007). O uso de terapia gênica envolvendo as TIMPs tem surgido como uma importante fonte de combate às diversas neoplasias como de próstata (DENG *et al.*, 2008) e em carcinomas hepatocelulares (XIA *et al.*, 2006).

Nossos resultados indicam de uma maneira geral, que as TIMPs -2, -3 e -4 parecem ter um efeito protetor contra a progressão tumoral, mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar melhor o papel dessas moléculas frente à invasão tumoral e de se montar

estratégias terapêuticas, baseadas nas propriedades inibitórias das TIMPs, mais eficientes no combate às neoplasias.

### **5.8 E-caderina (CDH1)**

A expressão de genes da família das caderinas tem uma importância crítica no desenvolvimento e progressão de tumores, incluindo os tumores do SNC. Para ocorrer o desprendimento de células da massa tumoral primária, as quais irão promover a invasão e formação de metástases, mudanças moleculares significativas devem ocorrer na via de adesão celular (HOWNG *et al.*, 2002). A redução da expressão de *CDH1* é considerada como um dos principais eventos moleculares envolvidos na disfunção do mecanismo de adesão célula-célula, disparando a invasão tumoral e metástases (PEREGO *et al.*, 2002).

Nossos dados demonstraram que *CDH1* é menos expresso nos tumores neuroepiteliais de mais alto grau de malignidade (glioblastomas e meduloblastomas), enquanto que, os níveis de expressão desse gene nas amostras de substância branca não neoplásica e nos astrocitomas de baixo grau foram significativamente mais elevados. Essas observações indicam que *CDH1* é diferencialmente expresso entre os graus de malignidade dos tumores neuroepiteliais. Níveis significativamente maiores de expressão de *CDH1* foram observados nas amostras de tecido não neoplásico frente aos astrocitomas pilocíticos, sugerindo que a redução da expressão de *CDH1* é um evento precoce na tumorigênese das neoplasias neuroepiteliais. Os baixos níveis de expressão observados nos glioblastomas e nos meduloblastomas, os tumores mais agressivos e indiferenciados de nosso estudo sugerem ainda que, a diminuição da expressão do gene *CDH1* é uma característica marcante de malignidade. É importante ressaltar que não encontramos na literatura relatos a cerca da análise da expressão de *CDH1* através da técnica de RQ-PCR nos tumores neuroepiteliais.

Dados sobre a expressão de *CDHI* nos tumores neuroepiteliais são escassos. Estudos envolvendo imunohistoquímica nos astrocitomas de alto grau e meduloblastomas (UTSUKI *et al.*, 2002; 2004, respectivamente), demonstraram que a perda da expressão da E-caderina nesses tumores tem relação direta com o aumento da capacidade invasiva desses tumores. Resultados semelhantes também foram observados previamente por Asano *et al.* (2000) em astrocitomas de alto grau. Por outro lado, Schwechheimer *et al.* (1998) demonstraram que os tumores neuroepiteliais de comportamento menos agressivo, tais como: papilomas de plexo coróide e os meningiomas benignos, apresentaram maiores níveis de expressão da proteína E-caderina.

A diminuição da expressão de *CDHI* durante o desenvolvimento dos tumores neuroepiteliais pode ser realizado por mecanismos como hipermetilação das ilhas CpGs, repressores transcricionais (GARINIS *et al.*, 2002), mutações e alterações pós-transcricionais (MASTERSON *et al.*, 2007). Uhlmann *et al.* (2003) e Yu *et al.* (2004) relatam que a metilação aberrante global na região promotora do gene *CDHI* é um evento epigenético freqüente observado nos astrocitomas de alto grau. Esses autores sugerem ainda, que esse mecanismo epigenético é a causa mais importante da perda de expressão de *CDHI* nos tumores astrocíticos.

Entretanto, Fürhwald *et al.* (2001) observaram que a metilação da região promotora de *CDHI* parece ser um evento raro em meduloblastomas. Por outro lado, observações prévias de Russo *et al.* (1999) demonstraram que o *locus* 16q22.1, onde o gene *CDHI* está localizado, é freqüentemente delatado nos meduloblastomas. Essas observações podem ser uma das explicações possíveis para termos encontrado os menores níveis de expressão desse gene nos meduloblastomas.

A diminuição da expressão de E-caderina parecer estimular, ainda, o aumento da transcrição do gene *N-caderina*. Essa alteração molecular é associada à perda da morfologia epitelial e aquisição de características migratórias (VAN AKEN *et al.*, 2001). A diminuição da expressão de *CDH1* e o aumento da expressão de *N-caderina* já foram observadas em tumores neuroepiteliais por Asano *et al.* (2000) e Utsuki *et al.* (2002; 2004).

Resultados semelhantes aos nossos foram observados em outros tipos de cânceres tais como: gástricos (GRAZIANO *et al.*, 2003) e em carcinomas de mama (LOMBAERTS *et al.*, 2006), onde essa diminuição da expressão de *CDH1* foi correlacionada a desdiferenciação tumoral e baixa taxa de sobrevida. Nossas análises de sobrevida cumulativa não demonstraram diferenças na proporção de pacientes que apresentaram hiperexpressão do gene da *E-caderina* quando comparados com os pacientes com hipoexpressão de *CDH1*. Entretanto, alguns autores demonstraram que pacientes com baixa expressão de *CDH1* nos tumores epiteliais apresentavam sobrevida mais curta (CHEN *et al.*, 2003).

Em conclusão, nossos resultados sugerem, de uma maneira geral, que o desequilíbrio na expressão das *MMPs*, *TIMPs* e *CDH1* desempenha um papel crucial na progressão e, conseqüentemente, na agressividade dos tumores neuroepiteliais. Em vista disso, o completo entendimento da interação entre as moléculas que promovem/bloqueiam as vias de migração e adesão celular contribuirá de forma significativa para busca de novas terapias no combate da progressão dos tumores do SNC, uma vez que a natureza invasiva dos tumores neuroepiteliais é um grande entrave para a eficiência das terapias disponíveis para o tratamento desses tumores, principalmente no que se refere aos tumores de alto grau de malignidade.

## **6-CONCLUSÕES**

---



---

Neste trabalho foi realizada a investigação sobre alterações dos níveis de expressão de alguns genes de migração e adesão celular e suas relações com o comportamento biológico dos tumores neuroepiteliais. Também foram avaliadas as possíveis relações entre os níveis de expressão desses genes e a sobrevida dos pacientes acometidos por essas neoplasias. Diante dos objetivos propostos e dos resultados obtidos foram inferidas as seguintes conclusões:

1. Os tumores neuroepiteliais originados de células da glia expressam níveis significativamente maiores dos genes *MMP-9*, *MT1-MMP*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3*, *TIMP-4* e *CDH1* quando comparados aos tumores originados de células embrionárias.
2. Os níveis significativamente mais elevados dos genes *MMP-9* e *MT1-MMP*, encontrados nos tumores astrocíticos de alto grau de malignidade em relação aos demais tumores estudados, sugerem que essas MMPs estejam associadas à progressão e invasão dos tumores astrocíticos.
3. Os níveis significativamente mais elevados de *MMP-9* encontrados nos astrocitomas pilocíticos localizados no hipotálamo/vias ópticas/hipófise sugerem que essa alteração molecular seja importante para a maior agressividade desses tumores, quando comparados com os astrocitomas originados nos hemisférios cerebrais.
4. A expressão aumentada do gene *MMP-9* nos glioblastomas parece um importante fator prognóstico independente, relacionado a uma menor taxa de sobrevida nos pacientes acometidos por essa neoplasia, sustentando a hipótese de que existe uma associação da hiperexpressão desse gene e a agressividade dos tumores.

- 
5. Os níveis significativamente mais elevados dos genes *TIMP-*, *TIMP-3* e *TIMP-4*, encontrados nos tumores astrocíticos de baixo grau, quando comparados com os astrocitomas de alto grau de malignidade, parecem estar associados à resposta contra progressão tumoral, uma vez que, baixos níveis de expressão desses genes são encontrados no tecido não neoplásico.
  
  6. A expressão elevada do gene *CDHI* nas amostras de tecido não neoplásico, assim como, a diminuição da expressão desse gene observada ao longo da evolução tumoral, sugere que essa alteração molecular seja um evento precoce importante para a progressão tumoral. Embora, sem nenhum impacto na sobrevida dos pacientes acometidos por tumores de alto grau de malignidade e meduloblastomas.
  
  7. A elevação da expressão dos demais genes de migração celular estudados, quer seja isoladamente ou expressos conjuntamente em um mesmo paciente, não interfere na sobrevida global dos pacientes acometidos por astrocitomas de alto grau, por glioblastomas ou ainda por meduloblastomas.

## **7-REFERÊNCIAS**

---

- ALDOSARI, N.; WILTSHIRE, R.N.; DUTRA, A.; SCHROCK, E.; MCLENDON, R. E.; FRIEDMAN, H. S.; BIGNER, D. D.; BIGNER, S. H. Comprehensive molecular cytogenetic investigation of chromosomal abnormalities in human medulloblastoma cell lines and xenograft. **Neuro-oncol**, v.4,(2): 75-85, 2002.
- AMALINEI, C.; CARUNTU, I. D.; BALAN, R. A. Biology of metalloproteinases. **Rom J Morphol Embryol**, v.48(4):323-34, 2007.
- ARNOLD SM, Y. B., MUNN RK, NANAYAKKARA N, MARKESBERY WR. "Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Paired Primary Tumors and Brain Metastasis." **Clin Cancer Res** 5: 4028-4033, 1999.
- ARROYO AG, GENÍS L, GONZALO P, MATÍAS-ROMÁN S, POLLÁN A, GÁLVEZ BG. Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. **Curr Pharm Des.**;13(17):1787-1802, 2007
- ASANO, K.; KUBO, O.; TAJIKA, Y.; TAKAKURA, K.; SUZUKI, S. Expression of cadherin and CSF dissemination in malignant astrocytic tumors. **Neurosurg Rev**, v.23(1): 39-44, 2000.
- BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci**, v.115(19):3719-27, 2002.
- BAKER, A. H.; ZALTSMAN, A. B.; GEORGE, S. J.; NEWBY, A. C. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. **J Clin Invest**, v.101(6): 1478-87, 1998.
- BASILE JR, HOLMBECK K, BUGGE TH, GUTKIND JS. MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. **J Biol Chem.**;282(9):6899-68905, 2007.
- BATSCHE, E.; MUCHARDT, C.; BEHRENS, J.; HURST, H. C.; CREMISI, C. RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. **Mol Cell Biol**, v.18,(7): 3647-58, 1998.
- BECKER, K. F.; ROSIVATZ, E.; BLECHSCHMIDT, K.; KREMMER, E.; SARBIA, M.; HOFLE, H. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. **Cells Tissues Organs**, v.185(1-3): 204-12, 2007.
- BEHIN A, H.-X. K., CARPENTIER AF, DELATTRE JY. Primary brain tumours in adults. **Lancet** v. 361: 323-331, 2003.
- BELIVEAU, R.; DELBECCHI, L.; BEAULIEU, E.; MOUSSEAU, N.; KACHRA, Z.; BERTHELET, F.; MOUMDJIAN, R.; DEL MAESTRO, R. Expression of matrix

- metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. **Ann N Y Acad Sci**, v.886: 236-239, 1999.
- BENBOW, U.; BRINCKERHOFF, C. E. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? **Matrix Biol**, v.15,(8-9): 519-26, 1997.
- BERGERS, G.; JAVAHERIAN, K.; LO, K. M.; FOLKMAN, J.; HANAHAN, D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. **Science**, v.284(5415):808-812, 1999.
- BERGER W, SPIEGL-KREINECKER S, BUCHROITHNER J, ELBLING L, PIRKER C, FISCHER J, MICKSCHE M. Overexpression of the human major vault protein in astrocytic brain tumor cells. **Int J Cancer**.; 94(3): 377-382. 2001
- BERX, G.; BECKER, K. F.; HOFER, H.; VAN ROY, F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. **Hum Mutat**, v.12(4):226-37, 1998.
- BIGG, H. F.; SHI, Y. E.; LIU, Y. E.; STEFFENSEN, B.; OVERALL, C. M. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. **J Biol Chem**, v.272(24): 15496-500, 1997.
- BINDER DK, EVREN-KELES G, ALDAPE K, BERGER MS. Aggressive glial neoplasms. In: **Textbook of neurological surgery – principles and practice**. Batjer HH, Loftus CM. 1st edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia;. p. 1270-1280. 2003.
- BLOOMSTON, M.; SHAFII, A.; ZERVOS, E. E.; ROSEMURGY, A. S. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. **J Surg Res**, v.102(1):39-44, 2002.
- BODEY B, BODEY B JR, SIEGEL SE, KAISER HE. Matrix metalloproteinase expression in childhood astrocytomas **Anticancer Res**.;20(5A):3287-3292, 2000.
- BOZINOV, O.; KOHLER, S.; SAMANS, B.; BENES, L.; MILLER, D.; RITTER, M.; SURE, U.; BERTALANFFY, H. Candidate genes for the progression of malignant gliomas identified by microarray analysis. **Neurosurg Rev**, v.31, n.1, Jan, p.83-9; discussion 89-90. 2008.
- BRAND, K. Cancer gene therapy with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). **Curr Gene Ther**, v.2(2):255-271, 2002.
- BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim Biophys Acta**, v.1477(1-2): 267-283, 2000.
- BUTLER, G. S.; APTE, S. S.; WILLENBROCK, F.; MURPHY, G. Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. **J Biol Chem**, v.274 (16):10846-10851, 1999.

- CATERINA, N. C.; WINDSOR, L. J.; YERMOVSKY, A. E.; BODDEN, M. K.; TAYLOR, K. B.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; ENGLER, J. A. Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **J Biol Chem**, v.272(51):32141-32149, 1997.
- CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. **Biochim Biophys Acta**, v.1552(1): 39-45, 2001.
- CHAKRABORTI, S.; MANDAL, M.; DAS, S.; MANDAL, A.; CHAKRABORTI, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol Cell Biochem**, v.253(1-2): 269-285, 2003.
- CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, v.11(11): S37-43, 2001.
- CHEN, H. C.; CHU, R. Y.; HSU, P. N.; HSU, P. I.; LU, J. Y.; LAI, K. H.; TSENG, H. H.; CHOU, N. H.; HUANG, M. S.; TSENG, C. J.; HSIAO, M. Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas. **Cancer Lett**, v.201,(1):97-106, 2003.
- CHENG, S. M.; XING, B.; LI, J. C.; CHEUNG, B. K.; LAU, A. S. Interferon-gamma regulation of TNFalpha-induced matrix metalloproteinase 3 expression and migration of human glioma T98G cells. **Int J Cancer**, v.121(6):1190-1196, 2007.
- CHINTALA, S. K.; TONN, J. C.; RAO, J. S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. **Int J Dev Neurosci**, v.17,(5-6):495-502, 1999.
- CHIRCO, R.; LIU, X. W.; JUNG, K. K.; KIM, H. R. Novel functions of TIMPs in cell signaling. **Cancer Metastasis Rev**, v.25(1): 99-113. 2006.
- CHO, Y. B.; LEE, W. Y.; SONG, S. Y.; SHIN, H. J.; YUN, S. H.; CHUN, H. K. Matrix metalloproteinase-9 activity is associated with poor prognosis in T3-T4 node-negative colorectal cancer. **Hum Pathol**, v.38(11): 1603-1610, 2007.
- CHOPRA, A.; BROWN, K. M.; ROOD, B. R.; PACKER, R. J.; MACDONALD, T. J. The use of gene expression analysis to gain insights into signaling mechanisms of metastatic medulloblastoma. **Pediatr Neurosurg**, v.39(2):.68-74, 2003.
- CHRISTENSEN, H. C.; KOSTELJANETZ, M.; JOHANSEN, C. Incidences of gliomas and meningiomas in Denmark, 1943 to 1997. **Neurosurgery**, v.52(6): 1327-1333, 2003.
- CROCKER, S. J.; PAGENSTECHE, A.; CAMPBELL, I. L. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. **J Neurosci Res**, v.75,(1): 1-11, 2004.
- CURRAN S & MURRAY GI ("Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis." **Eur J Cancer** v 36: 1621-1630. 2000.

- CURRAN S, DUNDAS SR, BUXTON J, LEEMAN MF, RAMSAY R, MURRAY GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. **Clin Cancer Res.** 10(24):8229-8234, 2004.
- DAVIS, F. S. Epidemiology of brain tumors. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.7(12): Suppl, p.S3-6, 2007.
- DENG, X.; HE, G.; LEVINE, A.; CAO, Y.; MULLINS, C. Adenovirus-mediated expression of TIMP-1 and TIMP-2 in bone inhibits osteolytic degradation by human prostate cancer. **Int J Cancer**, v.122,(1):209-218, 2008.
- DERYUGINA, E. I.; BOURDON, M. A.; LUO, G. X.; REISFELD, R. A.; STRONGIN, A. Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. **J Cell Sci**, v.110 (19): 2473-2482, 1997.
- DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.25 (1):9-34, 2006.
- DUFFY, M. J.; MCGOWAN, P. M.; GALLAGHER, W. M. Cancer invasion and metastasis: changing views. **J Pathol**, v.214 (3): 283-293, 2008.
- EBINGER, M.; SENF, L.; WACHOWSKI, O.; SCHEURLEN, W. Promoter methylation pattern of caspase-8, P16INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-cadherin in medulloblastoma. **Pathol Oncol Res**, v.10,(1):17-21, 2004.
- EVREN-KELES G, BANERJEE A, PURI D, BERGER MS. Supratentorial gliomas. In: Pediatric CNS tumors. Gupta N, Banerjee AB, Haas-Kogan D (eds). 1<sup>st</sup> edition. Springer-Verlag. Berlin;. p. 7-26. 2004.
- EGBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.2(3): 161-174, 2002.
- ESTEVE, P. O.; TREMBLAY, P.; HOUDE, M.; ST-PIERRE, Y.; MANDEVILLE, R. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. **Biochim Biophys Acta**, v.1403,(1): 85-96, 1998.
- FISHER, J. L.; SCHWARTZBAUM, J. A.; WRENSCH, M.; WIEMELS, J. L. Epidemiology of brain tumors. **Neurol Clin**, v.25,(4):867-890, 2007.
- FORSYTH, P. A.; WONG, H.; LAING, T. D.; REWCASTLE, N. B.; MORRIS, D. G.; MUZIK, H.; LECO, K. J.; JOHNSTON, R. N.; BRASHER, P. M.; SUTHERLAND, G.; EDWARDS, D. R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. **Br J Cancer**, v.79,(11-12):1828-1835, 1999.
- FULLER GN, RHEE CH, HESS KR, CASKEY LS, WANG R, BRUNER JM, YUNG WK, ZHANG W. Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a revelation by parallel gene expression profiling. **Cancer Res.**; 59(17): 4228-4232.1999.

- FRUHWALD MC, O'DORISIO MS, DAI Z, TANNER SM, et al. (2001). Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas-implications for tumor biology and potential clinical utility. **Oncogene**, 20:5033-5042.
- GARDNER, J.; GHORPADE, A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. **J Neurosci Res**, v.74(6):.801-806, 2003.
- GARINIS, G. A.; MENOUNOS, P. G.; SPANAKIS, N. E.; PAPADOPOULOS, K.; KARAVITIS, G.; PARASSI, I.; CHRISTELI, E.; PATRINOS, G. P.; MANOLIS, E. N.; PEROS, G. Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. **J Pathol**, v.198,(4):.442-449, 2002.
- GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285(5430): 1028-1032, 1999.
- GILBERTSON, R. J. Medulloblastoma: signalling a change in treatment. **Lancet Oncol**, v.5(4):209-218, 2004.
- GILES, G. G. A. G., M.F. Epidemiology of brain tumors and factors in prognosis. **ER laws**, v.4: 47-67, 1995.
- GIROLDI, L. A.; BRINGUIER, P. P.; DE WEIJERT, M.; JANSEN, C.; VAN BOKHOVEN, A.; SCHALKEN, J. A. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v.241(2):453-458, 1997.
- GOMEZ, D. E.; ALONSO, D. F.; YOSHIJI, H.; THORGEIRSSON, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **Eur J Cell Biol**, v.74(2): 111-122, 1997.
- GONZALEZ-GOMEZ, P.; BELLO, M. J.; ARJONA, D.; LOMAS, J.; ALONSO, M. E.; DE CAMPOS, J. M.; VAQUERO, J.; ISLA, A.; GUTIERREZ, M.; REY, J. A. Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. **Int J Oncol**, v.22(3):601-608, 2003.
- GONZALEZ-GOMEZ, P.; BELLO, M. J.; LOMAS, J.; ARJONA, D.; ALONSO, M. E.; AMINOSO, C.; DE CAMPOS, J. M.; VAQUERO, J.; SARASA, J. L.; CASARTELLI, C.; REY, J. A. Epigenetic changes in pilocytic astrocytomas and medulloblastomas. **Int J Mol Med**, v.11(5):655-660, 2003.
- GRAZIANO F, HUMAR B, GUILFORD, P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. **Ann Oncol**, 14:1705-1713.,2003.
- GREENE, J.; WANG, M.; LIU, Y. E.; RAYMOND, L. A.; ROSEN, C.; SHI, Y. E. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. **J Biol Chem**, v.271(48):30375-30380, 1996.
- GROFT, L. L.; MUZIK, H.; REWCASTLE, N. B.; JOHNSTON, R. N.; KNAUPER, V.;



- LAFLEUR, M. A.; FORSYTH, P. A.; EDWARDS, D. R. Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. **Br J Cancer**, v.85,(1):55-63, 2001.
- GUARINO, M.; RUBINO, B.; BALLABIO, G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. **Pathology**, v.39,(3):305-318, 2007.
- GUO, P.; IMANISHI, Y.; CACKOWSKI, F. C.; JARZYNKA, M. J.; TAO, H. Q.; NISHIKAWA, R.; HIROSE, T.; HU, B.; CHENG, S. Y. Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 metalloproteinase, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. **Am J Pathol**, v.166,(3): 877-890, 2005.
- GURNEY JG & KADAN-LOTTICK N. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. **Curr Opin Oncol**. v 13(3): 160-166. 2001.
- HAYAKAWA, T.; YAMASHITA, K.; TANZAWA, K.; UCHIJIMA, E.; IWATA, K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. **FEBS Lett**, v.298(1): 29-32. 1992.
- HEUER, G. G.; JACKSON, E. M.; MAGGE, S. N.; STORM, P. B. Surgical management of pediatric brain tumors. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.7,(12): Suppl S61-68, 2007
- HILL JR, K. N., KURIYAMA H, ISRAEL MA. "Molecular Genetics of Brain Tumors." **Arch Neurol** 56: 439-441. 1999.
- HILSKA, M.; ROBERTS, P. J.; COLLAN, Y. U.; LAINE, V. J.; KOSSI, J.; HIRSIMAKI, P.; RAHKONEN, O.; LAATO, M. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. **Int J Cancer**, v.121,(4):714-723, 2007.
- HOE, H. S.; COOPER, M. J.; BURNS, M. P.; LEWIS, P. A.; VAN DER BRUG, M.; CHAKRABORTY, G.; CARTAGENA, C. M.; PAK, D. T.; COOKSON, M. R.; REBECK, G. W. The metalloproteinase inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. **J Neurosci**, v.27(40):10895-10905, 2007.
- HOLLIDAY, D. L.; HUGHES, S.; SHAW, J. A.; WALKER, R. A.; JONES, J. L. Intrinsic genetic characteristics determine tumor-modifying capacity of fibroblasts: matrix metalloproteinase-3 5A/5A genotype enhances breast cancer cell invasion. **Breast Cancer Res**, v.9(5): Suppl R67, 2007.
- HOQUE, M. O.; BEGUM, S.; BRAIT, M.; JERONIMO, C.; ZAHURAK, M.; OSTROW, K. L.; ROSENBAUM, E.; TROCK, B.; WESTRA, W. H.; SCHOENBERG, M.; GOODMAN, S. N.; SIDRANSKY, D. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. **J Urol**, v.179(2):743-747, 2008.
- HORMIGO, A.; GU, B.; KARIMI, S.; RIEDEL, E.; PANAGEAS, K. S.; EDGAR, M. A.; TANWAR, M. K.; RAO, J. S.; FLEISHER, M.; DEANGELIS, L. M.; HOLLAND, E. C.

- YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas. **Clin Cancer Res**, v.12(19): 5698-56704, 2006.
- HOWNG, S. L.; WU, C. H.; CHENG, T. S.; SY, W. D.; LIN, P. C.; WANG, C.; HONG, Y. R. Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors. **Cancer Lett**, v.183,(1):95-101, 2002.
- HUANG, H.; COLELLA, S.; KURRER, M.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. **Cancer Res**, v.60(24):6868-6874, 2000.
- HUANG, H.; HARA, A.; HOMMA, T.; YONEKAWA, Y.; OHGAKI, H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.64(10):891-901, 2005.
- INIESTA, P.; MORAN, A.; DE JUAN, C.; GOMEZ, A.; HERNANDO, F.; GARCIA-ARANDA, C.; FRIAS, C.; DIAZ-LOPEZ, A.; RODRIGUEZ-JIMENEZ, F. J.; BALIBREA, J. L.; BENITO, M. Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. **Oncol Rep**, v.17 (1):217-223, 2007.
- JAALINOJA, J.; HERVA, R.; KORPELA, M.; HOYHTYA, M.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. **J Neurooncol**, v.46,(1):81-90, 2000.
- JAIN, R. K.; DI TOMASO, E.; DUDA, D. G.; LOEFFLER, J. S.; SORENSEN, A. G.; BATCHELOR, T. T. Angiogenesis in brain tumours. **Nat Rev Neurosci**, v.8(8): 610-622, 2007.
- JO, Y.; YEON, J.; KIM, H. J.; LEE, S. T. Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on pro-matrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/insect-cell expression system. **Biochem J**, v.345(3):511-519, 2000.
- KACHRA, Z.; BEAULIEU, E.; DELBECCHI, L.; MOUSSEAU, N.; BERTHELET, F.; MOUMDJIAN, R.; DEL MAESTRO, R.; BELIVEAU, R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. **Clin Exp Metastasis**, v.17(7): 555-566, 1999.
- KAMAT, A. A.; FLETCHER, M.; GRUMAN, L. M.; MUELLER, P.; LOPEZ, A.; LANDEN, C. N., JR.; HAN, L.; GERSHENSON, D. M.; SOOD, A. K. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, v.12(6): 1707-1714, 2006.
- KAWATA, N.; NAGANE, Y.; HIRAKATA, H.; ICHINOSE, T.; OKADA, Y.; YAMAGUCHI, K.; TAKAHASHI, S. Significant relationship of matrix metalloproteinase 9 with nuclear grade and prognostic impact of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 for incidental clear cell renal cell carcinoma. **Urology**, v.69(6): 1049-53, 2007.

- KHATUA, S.; PETERSON, K. M.; BROWN, K. M.; LAWLOR, C.; SANTI, M. R.; LAFLEUR, B.; DRESSMAN, D.; STEPHAN, D. A.; MACDONALD, T. J. Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling. **Cancer Res**, v.63(8): 1865-1870, 2003
- KLEIHUES, P.; LOUIS, D. N.; SCHEITHAUER, B. W.; RORKE, L. B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P. C.; CAVENEE, W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.61,(3):215-25; discussion 226-229, 2002.
- KLEIHUES, P. C., WK. **World Health Organization classification of tumors .Pathology and genetics of tumors of the nervous system** Lion France. 2000 (IARC Press)
- KONDRAGANTI, S.; MOHANAM, S.; CHINTALA, S. K.; KIN, Y.; JASTI, S. L.; NIRMALA, C.; LAKKA, S. S.; ADACHI, Y.; KYRITSIS, A. P.; ALI-OSMAN, F.; SAWAYA, R.; FULLER, G. N.; RAO, J. S. Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. **Cancer Res**, v.60(24):6851-6855, 2000.
- KONG, L.; LI, Q.; WANG, L.; LIU, Z.; SUN, T. The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas. **Neuropathology**, v.27(6): 516-521, 2007.
- KOSHIKAWA, N.; GIANNELLI, G.; CIRULLI, V.; MIYAZAKI, K.; QUARANTA, V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. **J Cell Biol**, v.148(3):615-624, 2000.
- KUNISHIO, K.; OKADA, M.; MATSUMOTO, Y.; NAGAO, S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in astrocytic tumors. **Brain Tumor Pathol**, v.20(2):39-45, 2003.
- LAMBERT E, D. E., HAYE B, PETITFRERE E. "TIMPs as multifacial proteins." **Crit Rev Oncol Hematol** 49(3): 187-198. 2004.
- LAKKA, S. S.; GONDI, C. S.; RAO, J. S. Proteases and glioma angiogenesis. **Brain Pathol**, v.15(4):327-341, 2005.
- LAL, A.; LASH, A. E.; ALTSCHUL, S. F.; VELCULESCU, V.; ZHANG, L.; MCLENDON, R. E.; MARRA, M. A.; PRANGE, C.; MORIN, P. J.; POLYAK, K.; PAPADOPOULOS, N.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W.; STRAUSBERG, R. L.; RIGGINS, G. J. A public database for gene expression in human cancers. **Cancer Res**, v.59(21): 5403-5407, 1999.
- LAMFERS, M. L.; GIANNI, D.; TUNG, C. H.; IDEMA, S.; SCHAGEN, F. H.; CARETTE, J. E.; QUAX, P. H.; VAN BEUSECHEM, V. W.; VANDERTOP, W. P.; DIRVEN, C. M.; CHIOCCA, E. A.; GERRITSEN, W. R. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression from an oncolytic adenovirus inhibits matrix metalloproteinase activity in vivo without affecting antitumor efficacy in malignant glioma. **Cancer Res**, v.65,(20):9398-9405, 2005.

- LAMPERT, K.; MACHEIN, U.; MACHEIN, M. R.; CONCA, W.; PETER, H. H.; VOLK, B. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. **Am J Pathol**, v.153,(2): 429-437, 1998.
- LEE, S.; DESAI, K. K.; ICZKOWSKI, K. A.; NEWCOMER, R. G.; WU, K. J.; ZHAO, Y. G.; TAN, W. W.; ROYCIK, M. D.; SANG, Q. X. Coordinated peak expression of MMP-26 and TIMP-4 in preinvasive human prostate tumor. **Cell Res**, v.16 (9):750-758, 2006.
- LEVICAR, N.; NUTTALL, R. K.; LAH, T. T. Proteases in brain tumour progression. **Acta Neurochir (Wien)**, v.145,(9):825-838, 2003.
- LINET, M. S.; RIES, L. A.; SMITH, M. A.; TARONE, R. E.; DEVESA, S. S. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. **J Natl Cancer Inst**, v.91(12): 1051-1058, 1999.
- LOMBAERTS, M.; VAN WEZEL, T.; PHILIPPO, K.; DIERSSEN, J. W.; ZIMMERMAN, R. M.; OOSTING, J.; VAN EIJK, R.; EILERS, P. H.; VAN DE WATER, B.; CORNELISSE, C. J.; CLETON-JANSEN, A. M. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. **Br J Cancer**, v.94, n.5, Mar 13, p.661-71. 2006.
- LOUIS, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu Rev Pathol**, v.1: 97-117, 2006.
- LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER OD, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, SCHEITHAUER BW, KLEIHUES P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol.**;114(2):97-109, 2007
- MALEMUD, C. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. **Front Biosci**, v.11: 1696-701, 2006.
- MARTIN, M. D.; MATRISIAN, L. M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. **Cancer Metastasis Rev**, v.26.(3-4): 717-724, 2007
- MASTERSON, J.; O'DEA, S. Posttranslational truncation of E-cadherin and significance for tumour progression. **Cells Tissues Organs**, v.185(1-3):175-179, 2007.
- MATRISIAN, L. M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. **Trends Genet**, v.6 (4):121-125, 1990.
- MATRISIAN, L. M.; BOWDEN, G. T.; KRIEG, P.; FURSTENBERGER, G.; BRIAND, J. P.; LEROY, P.; BREATHNACH, R. The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83 (24): 9413-9417, 1986.
- MERCAPIDE, J.; LOPEZ DE CICCO, R.; CASTRESANA, J. S.; KLEIN-SZANTO, A. J. Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive

- properties of human astrocytoma cell lines. **Int J Cancer**, v.106(5): 676-682, 2003.
- MINO, N.; TAKENAKA, K.; SONOBE, M.; MIYAHARA, R.; YANAGIHARA, K.; OTAKE, Y.; WADA, H.; TANAKA, F. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and its prognostic significance in resected non-small cell lung cancer. **J Surg Oncol**, v.95 (3): 250-257, 2007.
- MOHANAM, S.; WANG, S. W.; RAYFORD, A.; YAMAMOTO, M.; SAWAYA, R.; NAKAJIMA, M.; LIOTTA, L. A.; NICOLSON, G. L.; STETLER-STEVENSON, W. G.; RAO, J. S. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo. **Clin Exp Metastasis**, v.13 (1): 57-62, 1995.
- MUCHA, S. A.; MELEN-MUCHA, G.; GODLEWSKI, A.; STEPIEN, H. Inhibition of estrogen-induced pituitary tumor growth and angiogenesis in Fischer 344 rats by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. **Virchows Arch**, v.450(3): 335-41, 2007.
- MUHLISCH, J.; BAJANOWSKI, T.; RICKERT, C. H.; ROGGENDORF, W.; WURTHWEIN, G.; JURGENS, H.; FRUHWALD, M. C. Frequent but borderline methylation of p16 (INK4a) and TIMP3 in medulloblastoma and sPNET revealed by quantitative analyses. **J Neurooncol**, v.83(1): 17-29, 2007.
- MUIR, C. S.; STORM, H. H.; POLEDNAK, A. Brain and other nervous system tumours. **Cancer Surv**, v.19-20: 369-392, 1994.
- MUNAUT, C.; NOEL, A.; HOUGRAND, O.; FOIDART, J. M.; BONIVER, J.; DEPREZ, M. Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. **Int J Cancer**, v.106 (6): Oct 10, p.848-855, 2003.
- MURATE, T.; YAMASHITA, K.; OHASHI, H.; KAGAMI, Y.; TSUSHITA, K.; KINOSHITA, T.; HOTTA, T.; SAITO, H.; YOSHIDA, S.; MORI, K. J.; ET AL. Erythroid potentiating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases on the differentiation of erythropoietin-responsive mouse erythroleukemia cell line, ELM-I-1-3, is closely related to its cell growth potentiating activity. **Exp Hematol**, v.21 (1): 169-176, 1993.
- NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathol Int**, v.52 (4): 255-264, 2002.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v.69(3): 562-573, 2006.
- NAGASE, H.; WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v.274 (31): 21491-21494, 1999.
- NAKADA, M.; KITA, D.; FUTAMI, K.; YAMASHITA, J.; FUJIMOTO, N.; SATO, H.; OKADA, Y. 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(3): 464-473, 2001.

- NAKADA, M.; NAKAMURA, H.; IKEDA, E.; FUJIMOTO, N.; YAMASHITA, J.; SATO, H.; SEIKI, M.; OKADA, Y. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. **Am J Pathol**, v.154 (2): 417-428, 1999.
- NAKAGAWA, T.; KUBOTA, T.; KABUTO, M.; SATO, K.; KAWANO, H.; HAYAKAWA, T.; OKADA, Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. **J Neurosurg**, v.81(1):69-77, 1994.
- NAKAMURA M, ISHIDA E, SHIMADA K, KISHI M, NAKASE H, SAKAKI T, KONISHI N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. **Lab Invest.**;85(2):165-175, 2005.
- NAKOPOULOU, L.; GAKIOPOULOU, H.; ZERVAS, A.; GIANNOPOULOU, I.; CONSTANTINIDES, C.; LAZARIS, A. C.; LIAPIS, H.; KYRIAKOU, G.; DIMOPOULOS, C. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.9 (2): 130-137, 2001.
- NAKOPOULOU, L.; GIANNOPOULOU, I.; LAZARIS, A.; ALEXANDROU, P.; TSIRMPA, I.; MARKAKI, S.; PANAYOTOPOULOU, E.; KERAMOPOULOS, A. The favorable prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 protein overexpression in breast cancer cells. **Apmis**, v.111 (11): 1027-1036, 2003.
- NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C. J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v.33,(10): 960-970, 2001.
- NOLLET, F.; BERX, G.; VAN ROY, F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Mol Cell Biol Res Commun**, v.2,(2): 77-85, 1999.
- NUTTALL, R. K.; PENNINGTON, C. J.; TAPLIN, J.; WHEAL, A.; YONG, V. W.; FORSYTH, P. A.; EDWARDS, D. R. Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. **Mol Cancer Res**, v.1(5):333-345, 2003.
- OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; MIZOGUCHI, A.; ADACHI, E.; SASAHARA, R. M.; NISHIMURA, S.; IMAMURA, Y.; KITAYAMA, H.; ALEXANDER, D. B.; IDE, C.; HORAN, T. P.; ARAKAWA, T.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, S.; ITOH, Y.; SEIKI, M.; ITOHARA, S.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v.107 (6): 789-800, 2001.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathol (Berl)**, v.109 (1): 93-108, 2005.
- OVERALL, C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations

for the post-trial era. **Nat Rev Cancer**, v.2 (9): 657-672, 2002.

OZEN, O.; KREBS, B.; HEMMERLEIN, B.; PEKRUN, A.; KRETZSCHMAR, H.; HERMS, J. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance. **Clin Cancer Res**, v.10 (14): 4746-4753, 2004.

PACKER RJ, ATER J, ALLEN J, PHILLIPS P, GEYER R, NICHOLSON HS, JAKACKI R, KURCZYNSKI E, NEEDLE M, FINLAY J, REAMAN G, BOYETTJM. Carboplatin and vincristine chemotherapy for children with newlydiagnosed progressive low-grade gliomas. **J Neurosurg**. 86(5): 747-754.1997

PACKER, R. J. Childhood medulloblastoma: progress and future challenges. **Brain Dev**, v.21(2):75-81, 1999.

PAGENSTECHE, A.; WUSSLER, E. M.; OPDENAKKER, G.; VOLK, B.; CAMPBELL, I. L. Distinct expression patterns and levels of enzymatic activity of matrix metalloproteinases and their inhibitors in primary brain tumors. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.60 (6): 598-612, 2001.

PAPI, A.; BARTOLINI, G.; AMMAR, K.; GUERRA, F.; FERRERI, A. M.; ROCCHI, P.; ORLANDI, M. Inhibitory effects of retinoic acid and IIF on growth, migration and invasiveness in the U87MG human glioblastoma cell line. **Oncol Rep**, v.18 (4): 1015-1021, 2007.

PEI, D.; KANG, T.; QI, H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. **J Biol Chem**, v.275(43): 33988-33997, 2000.

PEREGO C, VANONI C, MASSARI S, RAIMONDI A. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. **J Cell Sci**. 115: 3331-3340, 2002.

PINGOUD-MEIER CLD, JANSS AJ, RORKE LB, PHILLIPS PC . Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. **Clin Cancer Res** 9: 6401-6409. 2003.

POKUTTA, S.; WEIS, W. I. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.23:237-261, 2007.

POLETTE, M.; NAWROCKI-RABY, B.; GILLES, C.; CLAVEL, C.; BIREMBAUT, P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.49 (3): 179-186, 2004

POLKINGHORN, W. R.; TARBELL, N. J. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. **Nat Clin Pract Oncol**, v.4 (5): 295-304, 2007.

- POTTER R, CZECH TH, DIEKMANN K, SLAVC I, WIMBERGER-PRAYER D, BUDKA H. Tumours of central nervous system. In: Voûte PA, Kalifa C, Barret A (eds) **Cancer in children – clinical management**. Oxford University Press; 1998. p 172-192.
- RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol**, v.26(8): 587-596, 2007.
- RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat Rev Cancer**, v.3(7): 489-501, 2003.
- RAÏF EM. Effect of cyclic tensile load on the regulation of the expression of matrix metalloproteinases (MMPs -1, -3) and structural components in synovial cells. **J Cell Mol Med**. Jan 19. [Epub ahead of print], 2008
- REDIES, C. Cadherins in the central nervous system. **Prog Neurobiol**, v.61(6):611-648, 2000.
- REDIES, C.; TAKEICHI, M. Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. **Dev Biol**, v.180 (2): 413-423, 1996.
- RICKMAN, D. S.; BOBEK, M. P.; MISEK, D. E.; KUICK, R.; BLAIVAS, M.; KURNIT, D. M.; TAYLOR, J.; HANASH, S. M. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. **Cancer Res**, v.61 (18): 6885-6891, 2001.
- ROEBUCK, M. M.; HELLIWELL, T. R.; CHAUDHRY, I. H.; KALOGRIANITIS, S.; CARTER, S.; KEMP, G. J.; RITCHIE, D. A.; JANE, M. J.; FROSTICK, S. P. Matrix metalloproteinase expression is related to angiogenesis and histologic grade in spindle cell soft tissue neoplasms of the extremities. **Am J Clin Pathol**, v.123 (3): 405-414, 2005.
- ROOPRAI, H. K.; VAN METER, T.; RUCKLIDGE, G. J.; HUDSON, L.; EVERALL, I. P.; PILKINGTON, G. J. Comparative analysis of matrix metalloproteinases by immunocytochemistry, immunohistochemistry and zymography in human primary brain tumours. **Int J Oncol**, v.13 (6):1153-1157, 1998.
- RORIVE, S.; MARIS, C.; DEBEIR, O.; SANDRAS, F.; VIDAUD, M.; BIECHE, I.; SALMON, I.; DECAESTECKER, C. Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.65(8): 794-807, 2006.
- RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J Cell Mol Med**, v.9 (2): 267-285, 2005.
- RUSSO C, PELLARIN M, TINGBY O, BOLLEN AW, (1999). Comparative genomic hybridization in patients with supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors. **Cancer** 86: 331- 339 1999
- SAXENA A, S. L., DEAN M, ALI IU. ("Comparative molecular genetic profiles of



- anaplastic astrocytomas/glioblastomas multiforme and their subsequent recurrences." **Oncogene** **18**(6): 1385-1390.,1999
- SCHEWECHHEIMER K, Z. L., BIRCHMEIER W. "E-Cadherin in human brain tumors: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas." **Virchows Arch** **432**: 163-167, 1998
- SEIKI, M. Membrane-type matrix metalloproteinases. **Apmis**, v.107 (1):137-143, 1999.
- SHIOMI, T. O., Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers **Cancer and Metastasis Reviews**, v.22: 145-152, 2003.
- Society, A. C. **Cancer Facts and Figures** Atlanta American Cancer Society 1998
- SKLAR CA. Childhood brain tumors. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v 15(2): 669-673. 2002
- SOUNNI, N. E.; JANSSEN, M.; FOIDART, J. M.; NOEL, A. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. **Matrix Biol**, v.22 (1): 55-61, 2003.
- SROKA, I. C.; MCDANIEL, K.; NAGLE, R. B.; BOWDEN, G. T. Differential localization of MT1-MMP in human prostate cancer tissue: Role of IGF-1R in MT1-MMP expression. **Prostate**, v.68 (5): 463-476, 2008.
- STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J Pathol**, v.200 (4): 448-464, 2003.
- STERNLICHT, M. D. A. W., Z. How matrix metalloproteinase regulate cell behavior **Annu.Rev.Cell Dev. Biol**, v.17: 463-516, 2001.
- STROTHER DR, P. I., FISHER PG, HUNTER JV, WOO SY, POMEROY SL, RORKE LB. **Tumors of the central nervous system**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000
- SWENSEN, A. R.; BUSHHOUSE, S. A. Childhood cancer incidence and trends in Minnesota, 1988-1994. **Minn Med**, v.81 (12): 27-32, 1998.
- TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v.251(5000): 1451-1455, 1991.
- TETU, B.; BRISSON, J.; WANG, C. S.; LAPOINTE, H.; BEAUDRY, G.; BLANCHETTE, C.; TRUDEL, D. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. **Breast Cancer Res**, v.8(3): R28, 2006.
- UHLMANN, K.; ROHDE, K.; ZELLER, C.; SZYMAS, J.; VOGEL, S.; MARCZINEK, K.; THIEL, G.; NURNBERG, P.; LAIRD, P. W. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. **Int J Cancer**, v.106 (1): 52-59, 2003.
- UHM, J. H.; DOOLEY, N. P.; VILLEMURE, J. G.; YONG, V. W. Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloprotease-2 and protein kinase C. **Clin Exp Metastasis**, v.14

(5): 421-433, 1996.

- UTSUKI, S.; OKA, H.; SATO, Y.; TSUTIYA, B.; KONDO, K.; TANIZAKI, Y.; TANAKA, S.; FUJII, K. E. N-cadherins and beta-catenin expression in medulloblastoma and atypical teratoid/rhabdoid tumor. **Neurol Med Chir (Tokyo)**, v.44 (8): 402-406, discussion 407, 2004.
- UTSUKI, S.; SATO, Y.; OKA, H.; TSUCHIYA, B.; SUZUKI, S.; FUJII, K. Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. **J Neurooncol**, v.57 (3): 187-192, 2002.
- VAN AKEN, E.; DE WEVER, O.; CORREIA DA ROCHA, A. S.; MAREEL, M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. **Virchows Arch**, v.439 (6): 725-751, 2001.
- VAN DER VELDEN, V. H.; HOCHHAUS, A.; CAZZANIGA, G.; SZCZEPANSKI, T.; GABERT, J.; VAN DONGEN, J. J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, v.17(6): 1013-1034, 2003.
- VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87(14):5578-5582, 1990.
- VANMETER, T. E.; ROOPRAI, H. K.; KIBBLE, M. M.; FILLMORE, H. L.; BROADDUS, W. C.; PILKINGTON, G. J. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. **J Neurooncol**, v.53 (2): 213-235, 2001.
- VIHINEN, P.; KAHARI, V. M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. **Int J Cancer**, v.99 (2): 157-166, 2002.
- VINCE, G. H.; HERBOLD, C.; KLEIN, R.; KUHL, J.; PIETSCH, T.; FRANZ, S.; ROOSEN, K.; TONN, J. C. Medulloblastoma displays distinct regional matrix metalloprotease expression. **J Neurooncol**, v.53 (2): 99-106, 2001.
- VINCE, G. H.; WAGNER, S.; PIETSCH, T.; KLEIN, R.; GOLDBRUNNER, R. H.; ROOSEN, K.; TONN, J. C. Heterogeneous regional expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas. **Int J Dev Neurosci**, v.17 (5-6): 437-445, 1999.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v.92 (8): 827-839, 2003.
- WANG, H.; WANG, H.; SHEN, W.; HUANG, H.; HU, L.; RAMDAS, L.; ZHOU, Y. H.; LIAO, W. S.; FULLER, G. N.; ZHANG, W. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. **Cancer Res**,

- v.63 (15): 4315-4321, 2003.
- WANG, M.; LIU, Y. E.; GREENE, J.; SHENG, S.; FUCHS, A.; ROSEN, E. M.; SHI, Y. E. Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. **Oncogene**, v.14 (23): 2767-2774, 1997.
- WANG, M.; WANG, T.; LIU, S.; YOSHIDA, D.; TERAMOTO, A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. **Brain Tumor Pathol**, v.20 (2): 65-72, 2003.
- WATSON, S. A.; TIERNEY, G. Matrix metalloproteinase inhibitors: a review. **BioDrugs**, v.9(4): 325-35, 1998.
- WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell**, v.91 (4): 439-442, 1997.
- WILD-BODE, C.; WELLER, M.; WICK, W. Molecular determinants of glioma cell migration and invasion. **J Neurosurg**, v.94 (6): 978-984, 2001.
- WRENSCH, M.; MINN, Y.; CHEW, T.; BONDY, M.; BERGER, M. S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro-oncol**, v.4 (4): 278-299, 2002.
- XIA, D.; YAN, L. N.; XIE, J. G.; TONG, Y.; YAN, M. L.; WANG, X. P.; ZHANG, M. M.; ZHAO, L. Y. Overexpression of TIMP-1 mediated by recombinant adenovirus in hepatocellular carcinoma cells inhibits proliferation and invasion in vitro. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v.5, (3): 409-415, 2006.
- YAGI, T.; TAKEICHI, M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. **Genes Dev**, v.14 (10): 1169-1180, 2000.
- YAN, C.; BOYD, D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J Cell Physiol**, v.211 (1): 19-26, 2007.
- YANA, I.; SEIKI, M. MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination. **Clin Exp Metastasis**, v.19 (3): 209-215, 2002.
- YONG, V. W.; KREKOSKI, C. A.; FORSYTH, P. A.; BELL, R.; EDWARDS, D. R. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. **Trends Neurosci**, v.21 (2): 75-80, 1998.
- YU, J.; ZHANG, H.; GU, J.; LIN, S.; LI, J.; LU, W.; WANG, Y.; ZHU, J. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. **BMC Cancer**, v.4: 65, 2004
- ZHAI Y, HOTARY KB, NAN B, BOSCH FX, MUÑOZ N, WEISS SJ, CHO KR. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. **Cancer Res.** ;65(15):6543-6550, 2005

ZHAO, J. X.; YANG, L. P.; WANG, Y. F.; QIN, L. P.; LIU, D. Q.; BAI, C. X.; NAN, X.; SHI, S. S.; PEI, X. J. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in rat brain after implantation of 9L rat glioma cells. **Eur J Neurol**, v.14 (5): 510-516, 2007.

ZHU, Y. P., L. F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. **Nat Rev Cancer**, v.2 (8): 616-626, 2002.

ZINZINDOHOUE, F.; LECOMTE, T.; FERRAZ, J. M.; HOULLIER, A. M.; CUGNENC, P. H.; BERGER, A.; BLONS, H.; LAURENT-PUIG, P. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v.11(2) :594-599, 2005.

## **ANEXOS**

---



www.hcrp.fmrp.usp.br



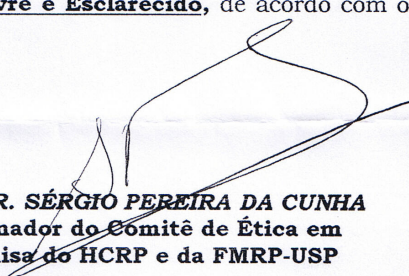
Ribeirão Preto, 06 de dezembro de 2006

Ofício nº 3492/2006  
CEP/SPC

**Prezado Senhor,**

O trabalho intitulado “**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE MIGRAÇÃO E ADESÃO CELULAR EM TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CRIANÇAS E ADULTOS**”, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 238ª Reunião Ordinária realizada em 04/12/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 11458/2006.

Atenciosamente.

  
**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor  
**FÁBIO JOSÉ NASCIMENTO MOTTA**  
**PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE (Orientador)**  
Depto. de Puericultura e Pediatria  
Laboratório de Oncopediatria

---

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário

FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186

Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br  
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

CEP. 14048-900  
RIBEIRÃO PRETO - S.P.  
B R A S I L

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

**ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA**

1. NOME DA PESQUISA: " **ESTUDO DA EXPRESSÃO E MIGRAÇÃO E ADESÃO CELULAR EM NEOPLASIAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CRIANÇAS E ADULTOS**".
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fábio José Nascimento Motta.
3. PROMOTOR DA PESQUISA: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

**ESCLARECIMENTOS**

Existem novos exames genéticos que podem ajudar muito o conhecimento dos tumores cerebrais da criança e do adolescente. Esses exames são feitos no material que normalmente é colhido (procedimento cirúrgico) para os exames utilizados para o diagnóstico e estudam profundamente como estas neoplasias surgem no paciente e como elas poderão ser melhores tratadas. Estes conhecimentos poderão, no futuro, tornar possíveis tratamentos novos e melhores para outros pacientes. Todo o material que será utilizado para o estudo provém do procedimento realizado de rotina (procedimento cirúrgico). Portanto, não haverá um desconforto ou procedimento adicional, realizado somente para a pesquisa. Os resultados dos trabalhos serão publicados e lhes serão fornecidos, mas seu nome e de seus familiares não serão identificados. O tratamento do paciente está garantido em qualquer tempo, mesmo que você não concorde em colaborar. A participação não lhe trará nenhum gasto; somente benefícios à ciência.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Prof. Dr. Luís Gonzaga Tone



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

CEP. 14048-900  
RIBEIRÃO PRETO - S.P.  
B R A S I L

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Eu, \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “ESTUDO DA EXPRESSÃO E MIGRAÇÃO E ADESÃO CELULAR EM NEOPLAISAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CRIANÇAS E ADULTOS” que tem como pesquisador responsável: Fábio José Nascimento Motta, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhado(a) e assistido(a) durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

---

**Assinatura do paciente (ou responsável)**



## **ANEXO DE PUBLICAÇÃO**

---

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)