FERNANDA AUGUSTA DE LIMA BARBOSA

EFEITO DA SINVASTATINA NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *RECK* E SUAS ISOFORMAS EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

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

Orientadora: Profa. Dra. Sheila M. B.Winnischofer

Co-orientadora: Profa. Dra. Glaucia R. Martinez

CURITIBA

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

“Sirvam as nossas façanhas de modelo a toda Terra...”

“Têm coisas que tem seu valor
Avaliado em quilates, em cifras e fins
E outras não têm o apreço
Nem pagam o preço que valem pra mim

Tenho uma velha saudade
Que levo comigo por ser companheira
E que aos olhos dos outros
Parecem desgostos por ser tão caseira

Não deixo as coisas que eu gosto
Perdidas aos olhos de quem procurar
Mas olho o mundo na volta
Achando outra coisa que eu possa gostar

Tenho amigos que o tempo
Por ser indelével, jamais separou
E ao mesmo tempo revejo
As marcas de ausência que ele me deixou...

Carrego nas costas meu mundo
E junto umas coisas que me fazem bem
Fazendo da minha janela
Imenso horizonte, como me convém

Das vozes dos outros eu levo a palavra
Dos sonhos dos outros eu tiro a razão
Dos olhos dos outros eu vejo os meus erros
Das tantas saudades eu guardo a paixão

Sempre que eu quero, revejo meus dias
E as coisas que eu posso, eu mudo ou arrumo
Mas deixo bem quietas as boas lembranças
Vidinha que é minha, só pra o meu consumo...”

Luiz Marenco
Pra o meu consumo

À minha mãe, Gisa.

O passo inicial do seu maior sonho,

que são três Doutores sentados à mesa

em um domingo qualquer no futuro.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora das Graças, por iluminarem meu caminho, tantas vezes trilhado só, e por não me deixarem perder a fé de que eu conseguiria realizar tudo a contento, mesmo quando pensei que não fosse conseguir.

À minha mãe, Gisa, espelho e porto seguro da minha vida. Obrigada por ter me conduzido pelo caminho do bem e do respeito até aqui. Sem teu conselho e amparo eu nada seria. Eu trabalho para te proporcionar orgulho e alegria em agradecimento por todas as coisas que tu já fizeste por mim.

Ao meu pai verdadeiro do coração, Valdir, por simplesmente ser quem é, e por tantos anos de cuidado e amor sem limites por mim e pelos meus irmãos.

Aos meus irmãos Álvaro e Augusto, amores da minha vida. Há quem diga que os melhores brinquedos são os irmãos, e disso eu tenho plena certeza... O futuro é de vocês, criados no amor e no exemplo de que se deve ter esforço e determinação para prosperar.

Aos meus avós Adão e Genesi, pelas saudades, pelas histórias, pelo exemplo, pela preocupação, pelas orações, pelo incentivo e pelo amor que me dedicam desde sempre. Por tudo. Nunca saberei expressar direito o que vocês representam para mim.

À toda a minha família, e àqueles que, por mais que eu não veja com a frequência que gostaria, sabem que são importantes na caminhada que escolhi seguir.

À minha orientadora, Prof. Dra. Sheila M. B. Winnischofer, pela confiança, paciência e carinho com que me conduziu no trabalho com um assunto tão complexo. És uma pessoa iluminada e uma profissional exemplar. Obrigada por compartilhar teu conhecimento comigo e por ser sempre tão especial. Quando eu “crescer”, quero ser que nem você...

Aos demais professores do Grupo de Oxidações Biológicas, pelo convívio, e em especial à minha co-orientadora, Prof. Dra. Glaucia Regina Martinez, pelos conselhos e orientações.

Aos colaboradores do Instituto de Química da USP, em especial à Prof. Dra. Mari Cleide Sogayar, pelo suporte na realização deste trabalho, e à Marina Trombetta Lima, por toda a ajuda, e por ser uma pessoa muitíssimo querida.

À minha mãe do coração, Regina. Presença constante em minha vida desde o início deste trabalho, a quem devo muitos pequenos e grandes favores. Pessoa que

merece toda a admiração do mundo pela fé, coragem e ousadia. Que todos um dia possam compreender a graça e a alegria que é conviver contigo. Obrigada por tudo, tu és o anjo de Deus na minha vida.

À minha amiga querida Carol Valente, pela amizade verdadeira, pela ajuda nos experimentos, troca de materiais e pelo convívio sempre divertido. Mereces todo o sucesso do mundo, e és, para mim, um exemplo de determinação, comprometimento e disciplina.

Aos demais colegas do Grupo de Oxidações Biológicas, em especial: Gisele, Glaucio, Amanda, Hudson, Thiago e Paulo, pela ajuda, conversas e trocas de ideias e protocolos.

Aos amigos, de longe e de perto, pelas horas de distração. Ao Anderson e ao Jeff, por dividirem a mãe deles comigo. À minha amiga amada Denise, pelas horas de conversa e risadas, virtual ou pessoalmente. Às amigas do tempo de faculdade, Nina, Eli e Lê, nunca vou esquecer de vocês. Aos amigos Claudio, Márcia e Evonilza que mesmo muito tempo ausentes, quando aparecem (ou quando eu apareço) fazem as horas valerem a pena... Que bom que é ter vocês na minha vida.

Aos alunos e professores dos departamentos de Fisiologia, Patologia e do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, pela disponibilidade de ajudar no manuseio de equipamentos e realização de algumas técnicas.

Às agências financiadoras do projeto: Fundação Araucária, FAPESP, CNPq, INCT de Processos Redox em Biomedicina - Redoxoma e CAPES, esta última em especial, pela bolsa.

Àqueles, aos quais eu possa ter esquecido de mencionar individualmente, ou pelo nome, que perdoem a falha e recebam meu carinho.

À minha querência querida, o Rio Grande do Sul, e por todas as pessoas com quem lá convivi, e que sabem apreciar e demonstrar a tradição, a hospitalidade e a garra dos gaúchos. Sirvam as nossas façanhas de modelo a toda Terra...

A todos aqueles que, de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

O melanoma é um tipo de tumor que se origina dos melanócitos, sendo altamente resistente às terapias convencionais, especialmente quando se encontra em condições de metástase, o que torna necessário a busca por novas alternativas de tratamento. O processo de metástase, em geral, é facilitado pela ação das metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular, favorecendo a invasão. Entre os elementos que podem regular a atividade de MMPs está RECK, uma glicoproteína ancorada à membrana celular. Tendo em vista que as estatinas são drogas que inibem a síntese de colesterol e isoprenóides podendo interferir na composição da membrana das células, e também que vários trabalhos relatam a ação antitumoral destas drogas, inclusive em linhagens celulares de melanoma, este trabalho avaliou o efeito do tratamento de células de melanoma humano (SK-MEL 28) com doses variadas de uma estatina (sinvastatina) em relação aos níveis de RNAm de *RECK* (e suas isoformas alternativas de *splicing*), *MMPs* e *TIMPs* e aos processos de proliferação e viabilidade celular. As análises de viabilidade celular (realizadas pelo método de cristal violeta) demonstraram que o tratamento com sinvastatina é capaz de provocar redução de viabilidade das células SK-MEL 28, e que esta redução é dose e tempo dependente. A análise do ciclo celular (realizada por citometria de fluxo) demonstrou a parada das células SK-MEL 28 em G1 com a concomitante diminuição da quantidade de células na fase G2-S e o aumento da porcentagem de células na fase Sub-G1, após 72h de exposição às diferentes doses de sinvastatina. A análise dos perfis de expressão dos genes de interesse foi investigado através de ensaios de PCR quantitativo em Tempo Real. Os resultados indicam que não ocorre modulação da expressão da forma canônica de *RECK* (RECK-A) (tanto de mRNA como de proteína), tampouco das isoformas RECK-D e RECK-I após o tratamento com o agente antitumoral. Ocorre diminuição dos níveis de RNAm da isoforma B de *RECK*, após o tratamento com 1 e 5µM de sinvastatina por 72h. Nas mesmas doses de sinvastatina observa-se uma tendência a diminuição da expressão de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP*, embora não seja estatisticamente significativa. Também ocorre tendência à redução da quantidade de transcrito de *TIMP-1*, ao passo que há redução significativa da expressão de *TIMP-2* após tratamento com 5µM de sinvastatina. Foi ainda verificado que as razões entre as expressões relativas de RECK-A/MMP-2 e RECK-B/MMP-2 aumentam significativamente quando as células SK-MEL 28 são tratadas com 1µM de sinvastatina por 72h, sugerindo que o deslocamento do balanço proteolítico a favor de *RECK* pode contribuir para as ações antitumorais exercidas pela sinvastatina. Nossos dados sugerem, ainda, que RECK-A e RECK-B sejam regulados de maneira distinta nas células de melanoma (pelo menos após o tratamento com sinvastatina) e talvez a maior ou menor atividade de MMPs nas células possa ser devido à uma ação conjunta destas duas isoformas de *RECK*. Estas observações corroboram com os dados obtidos nesse trabalho que mostram uma tendência evidente de diminuição de expressão de todas as MMPs avaliadas (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP) após o tratamento com a droga.

ABSTRACT

Melanoma is a cancer that arises from melanocytes. In its early stages malignant melanoma can be cured by surgical resection, but once it has progressed to the metastatic stage it is extremely difficult to treat and does not respond to current therapies, being necessary the study for new therapeutic approaches to this disease. Matrix metalloproteinases (MMPs) show multiple functions as extracellular/cell surface enzymes, and are broadly recognized for their matrix-degrading ability and involvement in cell motility and invasion. The activity of MMPs is regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and RECK (that's encodes a membrane-anchored protein which suppresses invasion/metastasis by negatively regulating MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP). Considering that statins (in addition to downregulating cholesterol levels) exert effects anti-inflammatory and anti-proliferative in several types of tumor cell lines, the main interest of this study was to correlate the action of a statin (specifically: simvastatin) with the modulation of mRNA levels of *RECK*, its alternative splicing isoforms, *MMPs* and TIMPs in the melanoma cell line (SK-MEL 28). The cell viability analysis (through crystal violet staining) shows that simvastatin treatment is able to reduction the cell viability in a dose and time dependent way. The effect of the simvastatin treatment in the cell cycle progression of SK-MEL 28 cells was evaluated by flow citometry. Our results show cell arrest in G1, reduction of percentage of cells in the G2-S phase and increased of percentage of cells in the Sub-G1 phase, after simvastatin treatment by 72h. In order to evaluate the molecular mechanism involved in the anti-proliferative effects of simvastatin in melanoma cells, we analyzed the mRNA expression profiles (through quantitative real time RT-PCR assays) of the *RECK* gene (canonical form and alternative isoforms, namely: RECK B, RECK D and RECK I), *MMPs* and *TIMPs* in SK-MEL 28 cells treated with simvastatin at 1µM and 5µM for 72h. The results show no modulation of the expression levels of RECK-A, RECK-D and RECK-I after simvastatin treatment. On the other hand, the RECK-B mRNA levels are significantly reduced upon treatment with 1 and 5µM of simvastatin. The mRNA expression levels of *MMP-2*, *MMP-9*, *MT1-MMP* and *TIMP-1* were not significantly altered. We also observed significantly reduced expression of *TIMP-2* after treatment with 5µM of simvastatin. In addition, the expression ratios RECK-A/MMP-2 and RECK-B/MMP-2 are significantly higher upon treatment with 1µM of simvastatin by 72h. Our results suggest that RECK-B can be modulated in a distinct manner of the canonical form (RECK-A) after simvastatin treatment and, suggest that the control of MMPs activity could involved the synergistic action of both *RECK* isoforms (RECK-A and RECK-B) and *TIMP-2*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA..... 19
FIGURA 2 – PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MELANOMA..... 25
FIGURA 3 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DAS GTPases Rho..... 27
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SINVASTATINA E SUA AÇÃO NA CASCATA DO MEVALONATO..... 29
FIGURA 5 – PROPOSTA DE MECANISMO INTRACELULAR DA MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO TGF-β1 MEDIADA POR SINVASTATINA..... 31
FIGURA 6 – ESTRUTURA E DOMÍNIOS DAS MMPs..... 36
FIGURA 7 – ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DE RECK..... 40
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DO DÍMERO RECK..... 41
FIGURA 9 – ESTRUTURA DO GENE *RECK* E SUAS VARIANTES..... 46
FIGURA 10 – PROTEÍNAS PREDITAS CODIFICADAS PELOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK* 47
FIGURA 11 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 60
FIGURA 12 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 62
FIGURA 13 – MICROGRAFIAS DE CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 64
FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA)..... 65
FIGURA 15 – PORCENTAGENS DE CÉLULAS SK-MEL 28 NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS 72h DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 67
FIGURA 16 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DIFERENTES TRANSCRITOS DE *RECK* EM CÉLULAS SK-MEL 28 FRENTE AO TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 69
FIGURA 17 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE *MMPs* EM CÉLULAS SK-MEL 28 TRATADAS COM SINVASTATINA..... 71
FIGURA 18 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE *TIMPs* EM CÉLULAS SK-MEL 28 TRATADAS COM SINVASTATINA..... 72
FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/*MMP-2*..... 73

FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/*MT1-MMP*..... 74
FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/*MMP-9*..... 75
FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS/TRANSCRITO CANÔNICO DE *RECK*..... 77
FIGURA 23 – ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA RECK PRESENTE EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 79
FIGURA 24 – PROPOSTA DE MODELO DE REGULAÇÃO DA ISOFORMA B DE *RECK* EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO TRATADAS COM SINVASTATINA..... 87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL..... 57

TABELA 2 – PORCENTAGENS DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS 72h DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA 66

TABELA 3 – RAZÕES INIBIDOR/*MMP-2* 73

TABELA 4 – RAZÕES INIBIDOR/*MT1-MMP* 74

TABELA 5 – RAZÕES INIBIDOR/*MMP-9* 75

TABELA 6 – RAZÕES RELATIVAS DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS/TRANSCRITO CANÔNICO DE *RECK* EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS

AMF	Fator de Motilidade Autócrino
Apaf-1	Fator Ativador de Peptidase Apoptótica 1
BSA	Soro Albumina Bovina
CDK	Quinase Dependente de Ciclinas
cDNA	DNA complementar
cEBP	CCAAT/*Enhancer Binding Protein*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA Metiltransferase
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FPP	Farnesil Pirofosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GDP	Guanosina difosfato
GGPP	Geranilgeranil Pirofosfato
GHRHR	receptor de hormônio liberador do hormônio de crescimento
GNEF	Fator de Troca de Nucleotídeo de Guanina
GTP	Guanosina trifosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A
hMVECS	células endoteliais microvasculares humanas
HPRT	Hipoxantina Fosforibosil Transferase
IL-6	Interleucina-6
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
mRNA	RNA mensageiro
MT-MMP	Metaloproteinase de Matriz do tipo associado à Membrana

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF-κB	Fator Nuclear κB
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Solução Salina Fosfato Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase
PIP_2	Fosfatidilinositol-4,5-difosfato
PIP_3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína Quinase B
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorido
Rb	Proteína do Retinoblastoma
PTEN	Fosfatase lipídica homóloga a Tensina e à Fosfatase
RECK	*Reversion-Inducing Cisteine-Rich Protein with Kazal Motifs*
RGP	Fase de Crescimento Vertical
ROCK	Quinase Rho
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF-β1	Fator de Crescimento Tumoral β1
TIMP	Inibidor Tissular de Metaloproteinase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TNF-R1	Receptor (do tipo 1) do Fator de Necrose Tumoral
TPB	Proteína de Ligação TATA
UV	Ultravioleta
VGP	Fase de Crescimento Vertical

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 MELANOMA: ETIOLOGIA E PATOGÊNESE..... 18
2.1.1 Classificação histológica dos melanomas..... 19
2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MELANOMA..... 20
2.2.1 Via da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK)..... 20
2.2.2 Via Fosfatidilinositol 3 Quinase (PI3K) 21
2.2.3 Proteína do Retinoblastoma (Rb)..... 23
2.2.4 Proteínas Rho..... 25
2.3 ESTATINAS 28
2.3.1 Síntese do Colesterol..... 28
2.3.2 Origem e Mecanismo de Ação das Estatinas..... 29
2.3.3 Ação Antitumoral das Estatinas..... 31
2.3.4 Efeito das Estatinas em Células de Melanoma 32
2.4 A MATRIZ EXTRACELULAR E AS METALOPROTEINASES DE MATRIZ..... 34
2.4.1 A Matriz Extracelular: Estrutura em Função..... 34
2.4.2 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)..... 35
2.4.2.1 MMPs e estatinas 37
2.4.2.2 MMPs e melanoma..... 38
2.5 RECK: UM NOVO INIBIDOR DE MMPs..... 39
2.5.1 Origem e estrutura..... 39
2.5.2 Funções de RECK..... 41
2.5.3 Mecanismos de controle de *RECK*..... 44
2.5.3.1 Inibição *de RECK* por Ras. 44
2.5.3.2 Outros mecanismos de modelação de *RECK*..... 45
2.5.4 Isoformas alternativas de *RECK*..... 45
3 JUSTIFICATIVA 48
4 OBJETIVOS..... 50
5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL..... 51
6 MATERIAIS E MÉTODOS..... 52
6.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR..... 52

6.1.2 Esterilização de materiais 52
6.2 SOLUÇÕES, MEIOS DE CULTURA E MATERIAIS 52
6.2.1 Solução Salina Tamponada (PBS)..... 52
6.2.2 Solução de Tripsina-EDTA..... 52
6.2.3 Solução de Sinvastatina..... 52
6.2.4 Meios de Cultura..... 53
6.2.5 Linhagens Celulares 53
6.2.6 Condições de Cultivo..... 53
6.2.7 Anticorpos para ensaio de *Western Blotting*..... 53
6.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR..... 54
6.3.1 Curva de Sobrevivência: técnica de cristal violeta..... 54
6.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA..... 54
6.4.1 Microscopia de contraste de fase..... 54
6.5 ENSAIOS PARA ANÁLISE DO CICLO CELULAR 55
6.5.1 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo..... 55
6.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *RECK* (E ISOFORMAS), *TIMPs* E *MMPs*..... 55
6.6.1 Análise dos níveis de RNAm após o tratamento com sinvastatina..... 55
6.6.1.1 Extração e purificação do RNA total celular e síntese do cDNA..... 55
6.6.1.2 Análise da modulação da expressão gênica..... 57
6.6.2 Extração e quantificação de proteínas..... 58
6.6.2.1 Extração de proteínas totais 58
6.6.2.2 *Western Blotting*..... 58
6.6.3 Ensaios de atividade enzimática (MMPs)..... 59
6.6.3.1 Zimografia gelatinosa..... 59
6.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 59
7 RESULTADOS 60
7.1 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA..... 60
7.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA 62
7.3 AVALIAÇÃO DE EFEITOS NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS SK-MEL 28 TRATADAS COM SINVASTATINA..... 64

7.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DE *RECK* E SEUS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *SPLICING* EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 67

7.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DE *MMPs* E SEUS INIBIDORES CLÁSSICOS (*TIMPs*) EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 70

7.6 ANÁLISE DAS RAZÕES INIBIDORES/*MMPs*..... 72

7.7 VARIAÇÃO DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK* EM RELAÇÃO AO TRANSCRITO CANÔNICO EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....76

7.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA RECK EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA..... 78

7.9 ATIVIDADE DE MMPs APÓS O TRATAMENTO DAS CÉLULAS SK-MEL 28 COM SINVASTATINA..... 79

8 DISCUSSÃO..... 81

9 CONCLUSÃO..... 88

10 PERSPECTIVAS..... 90

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 91

12 ANEXOS..... 101

1 INTRODUÇÃO

As estatinas são fármacos antilipêmicos que agem inibindo a síntese de colesterol e derivados isoprenóides (BARREIRO e FRAGA, 2008). Evidências suportam ainda que estas drogas podem exercer efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em diversas linhagens de células tumorais, incluindo células de melanoma (DEMIERRE *et al.*, 2005). Estudos clínicos com estatinas na prevenção de doença cardíaca indicam que os pacientes que utilizam estes medicamentos estão menos propensos a desenvolver o melanoma, mas não há consenso quanto a ação da droga na progressão da doença (FREEMAN *et al.*, 2006; KOOMEN *et al.*, 2007). Os estudos *in vitro*, entretanto, apontam a ação antitumoral das estatinas em células de melanoma através de mecanismos variados, destacando-se a sinvastatina como indutor de apoptose e parada do ciclo celular (SHELLMAN *et al.*, 2005; SAITO *et al.*, 2008). Outros efeitos da ação das estatinas em células de melanoma estão relacionados a alterações na adesão celular e diminuição da capacidade metastática das células (COLLISSON *et al.*, 2003; GLYNN *et al.*, 2008).

Considerando-se que o melanoma (e outros tipos de tumores) pode ser originário de alterações em diversos pontos de várias vias de sinalização regulatória, tais como MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e as proteínas Rho (CROWSON *et al.*, 2007), vários estudos têm procurado demonstrar o envolvimento das estatinas na restauração da função correta destas vias, ou ainda, em processos celulares relacionados a elas (CHAN *et al.*, 2003).

O papel das metaloproteinases de matriz no desenvolvimento tumoral é particularmente interessante, pois, em geral, níveis aumentados destas peptidases estão diretamente relacionados com aumento da invasividade celular. As MMPs são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, facilitando o movimento das células através dos tecidos (NAGASE e WOESSNER, 1999; VU e WERB, 2000). Entre as moléculas que podem modular a ação destas MMPs está RECK (*Reversion-Inducing Cisteine-Rich Protein with Kazal Motifs*), uma glicoproteína ancorada à membrana através de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MENG *et al.*, 2008). RECK pode agir através da inibição da transcrição, secreção ou da inibição direta da atividade enzimática de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (NODA *et al.*, 2003; TAKAGI *et al.*, 2009), sendo

considerado um supressor tumoral por esta atividade.

Levando em consideração que RECK é uma proteína supressora da invasividade, que está ancorada à membrana lipídica, e que as estatinas possuem ação antitumoral por diversos mecanismos, este trabalho tem por objetivo avaliar a ação da sinvastatina na modulação dos níveis de expressão de *RECK* e de suas isoformas alternativas de *splicing* em células de melanoma. Para este fim, serão utilizadas células de melanoma humano SK-MEL 28 não tratadas ou tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina. A observação dos efeitos deste fármaco sobre as células será feita utilizando técnicas que avaliam a viabilidade celular, através de curva de crescimento; verificação da ocorrência de parada de proliferação, através de citometria de fluxo; avaliação da expressão de *RECK* e de suas isoformas, e da expressão das *MMPs* e *TIMPs*, através da verificação dos níveis de mRNA, proteína e ensaios de atividade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELANOMA: ETIOLOGIA E PATOGÊNESE

Os melanócitos são células pigmentadas especializadas, encontradas predominantemente na pele e nos olhos, onde produzem a melanina. Os melanócitos cutâneos são originários de células de alta motilidade da crista neural, que migram até a pele durante o desenvolvimento embrionário, e então passam a se localizar na lâmina basal da epiderme, folículos pilosos e ocasionalmente na derme. Através da produção da melanina e de sua transferência aos queratinócitos, estas células protegem a pele dos efeitos danosos da radiação UV, pois o pigmento absorve e dissipa a energia da radiação. Os melanócitos, porém, são os precursores do melanoma, a forma mais fatal de câncer de pele (ISSELBACHER *et al.*, 1994; SLOMINSKI *et al.*, 2004; MILLER e MIHM, 2006; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

De todos os tumores de pele, o melanoma é o mais perigoso, e a sua incidência vem aumentando, apesar dos trabalhos de prevenção. O melanoma pode ser curado através da excisão cirúrgica, se diagnosticado precocemente. Entretanto, o melanoma metastático geralmente é resistente às terapias existentes, e possui prognóstico ruim, com baixo índice de sobrevida (ISSELBACHER *et al.*, 1994; DEMIERRE e SONDAK, 2005; FECHER *et al.*, 2007).

A homeostase dos melanócitos da pele é regulada pelos queratinócitos da epiderme e o balanço entre estas células é mantido através da regulação da divisão dos melanócitos. Mutações em genes reguladores do crescimento, alterações na produção de fatores de crescimento parácrinos e perda de moléculas de adesão (p. ex.: caderinas, capazes de regular a atividade das GTPases Rho e Rac, em resposta à radiação UV) contribuem para a interrupção da sinalização celular. Dessa forma, os melanócitos podem escapar da regulação, proliferando e espalhando-se, formando nevos e verrugas (HAASS *et al.*, 2004). Os névos geralmente são benignos, correspondendo a *clusters* de melanócitos senescentes junto à membrana basal, que podem permanecer quiescentes por muitos anos (MEYLE e GULDBERG, 2009). Entretanto, em alguns casos pode ocorrer progressão para o melanoma de crescimento radial (RGP), num estágio intermediário de lesão intraepidermal, que pode envolver microinvasão da derme. As células RGP podem progredir para a fase de

crescimento vertical (VGP), estágio mais perigoso no qual adquirem potencial metastático. O modelo de progressão do melanoma foi estabelecido por CLARK *et al.,* em 1984, e está destacado na figura 1. É importante frisar que nem todos os melanomas passam através destas fases individuais, podendo se desenvolver a partir de melanócitos isolados ou nevos, e progredir diretamente à forma metastática (MILLER e MIHM, 2006; MITCHELL *et al.*, 2006; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

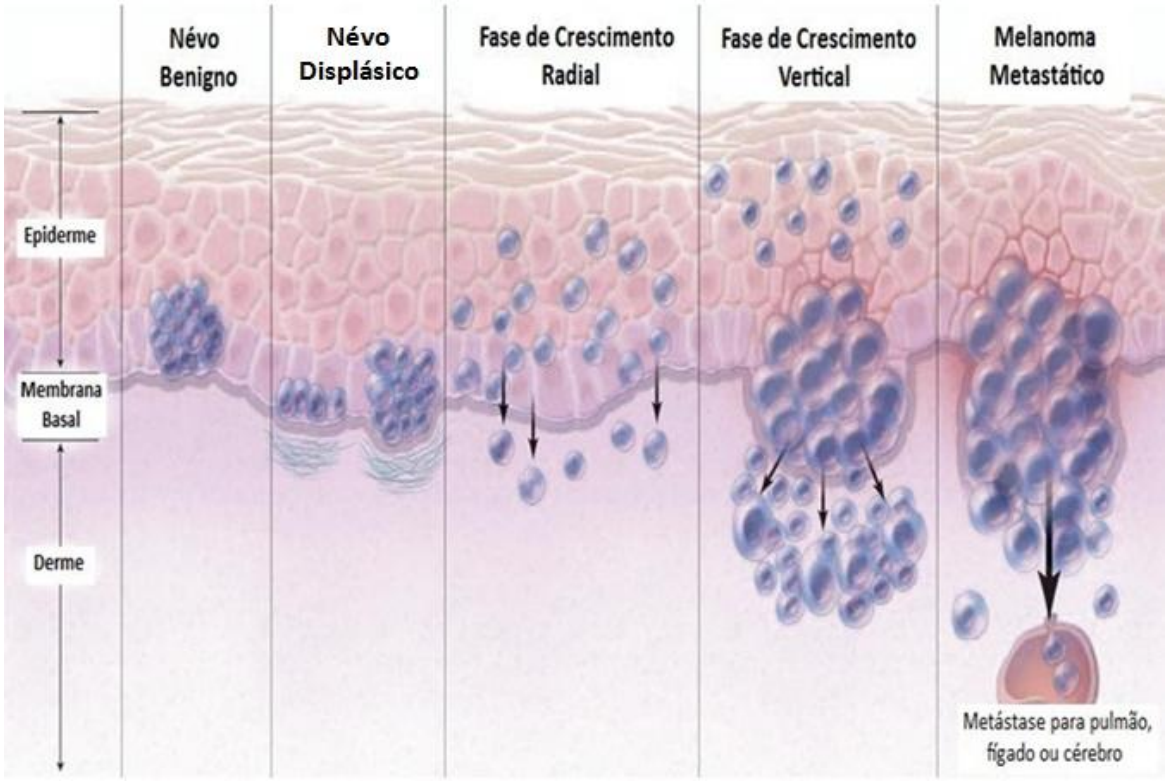


FIGURA 1 – ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA

NOTA: No modelo de Clark, os melanócitos progridem através de uma série de passos até a transformação maligna. O primeiro evento é a proliferação de melanócitos estruturalmente normais, o que leva ao névo benigno. O próximo passo é o início do desenvolvimento aberrante a partir de um névo preexistente ou em nova localização (névo displásico). Na fase de crescimento radial as células adquirem a capacidade de proliferação intraepidermal. Lesões que progridem para a fase de crescimento vertical são capazes de invadir a derme e formar nódulos, o que culmina na fase final (metastática), em que as células ganham a corrente sanguínea e podem chegar a outros órgãos (CLARK, *et al.,* 1984).
FONTE: Adaptado de MILLER e MIHM (2006).

2.1.1 Classificação histológica dos melanomas

Existem quatro subtipos histológicos principais de melanoma. O melanoma nodular consiste em nódulos salientes, sem porção superficial significante. O melanoma lentiginoso acral é encontrado nas palmas das mãos, solas dos pés e unhas,

não sendo associado, portanto, com a exposição à radiação UV. Já o melanoma lentiginoso maligno possui aparência plana e ocorre em regiões do corpo expostas ao sol, principalmente em idosos. Por último, o melanoma superficial apresenta-se como um tumor usualmente plano, de componente intraepidermal e ligado a episódios de queimadura solar severa. Este é o terceiro tipo de câncer mais comum entre jovens dos Estados Unidos e Inglaterra, sendo o subtipo mais comum de melanoma (ISSELBACHER *et al.*, 1994; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

A compreensão das alterações moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento e progressão dos melanomas é assunto de vários estudos recentes sobre a doença. DEMIERRE e SONDAK (2005) reforçam que o desenvolvimento do tumor resulta de interações complexas entre influências genéticas e ambientais.

2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MELANOMA

2.2.1 Via da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK)

A via MAPK regula o crescimento, sobrevivência, invasão celular e angiogênese e está envolvida no desenvolvimento de um amplo espectro de tumores. Atua através de receptores tirosina-quinases, citocinas e receptores acoplados a proteínas G (MARSHALL, 1994; PEYSSONNAUX e EYCHENE, 2001). A sinalização MAPK é iniciada na membrana celular, pela ligação de um ligante (geralmente um fator de crescimento) a um receptor tirosina-quinase ou por adesão das integrinas da matriz extracelular a seu receptor, que transmitem sinais ativadores via GTPase Ras, esta por sua vez presa ao folheto interno da membrana plasmática. Existem quatro isoformas conhecidas de Ras: N-Ras, Ha-Ras, Ki-Ras4A e Ki-Ras4B; estas diferem em sua capacidade de ativar as proteínas efetoras, as duas últimas sendo produtos de *splicing* do mesmo gene. A ativação de Ras depende de proteínas adaptadoras que se fixam a domínios fosfotirosina dos receptores ativados e ativam um GNEF (*guanine nucleotide exchange factor)*, que por sua vez ativa Ras através da troca de GDP por GTP. Ras então pode se ligar a proteínas efetoras e induzir proliferação e diferenciação celular através da ativação de outras vias de sinalização intracelular (BERNE e LEVY, 2000; PEYSSONNAUX e EYCHENE, 2001; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Quando RAS está inativa, as células não podem responder aos fatores de crescimento que atuam por meio deste receptor

tirosina-quinase (BERNE e LEVY, 2000).

As proteínas efetoras de Ras melhor caracterizadas até o momento são Raf e a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K). A família das serina/treonina-quinases Raf inclui três proteínas quinases citosólicas, A-Raf, B-Raf e Raf-1 (C-Raf), sendo que destas, B-Raf é a principal ativadora de MAPK. Uma proteína Raf ativada fosforila e ativa MAPK, e a cascata culmina na ativação de ERK (quinase ativada por sinal extracelular). ERKs transmitem sinais proliferativos e de sobrevivência celular através da fosforilação de vários alvos no citoplasma, citoesqueleto e fatores de transcrição nucleares (PEYSSONNAUX e EYCHENE, 2001).

Os estudos de COHEN *et al.* (2002) estimaram que ERK esta ativada em mais de 90% dos melanomas humanos, e que MAPK ativa pode ser detectada em pequenas quantidades em nevos atípicos, estando constitutivamente ativa nos estágios mais tardios do tumor. Além disso, o componente mutado mais comum nesta via é B-Raf, que sofre mutação em cerca de 66% a 68% dos melanomas (DAVIES *et al.*, 2002; POLLOCK *et al.*, 2003), e em 82% dos nevos benignos (POLLOCK *et al.*, 2003). Mutações ativadoras de Ras também ocorrem frequentemente no câncer, estando presentes em cerca de 36% dos melanomas, sendo que a maioria destas mutações foi detectada em amostras de tumores em estágio mais avançado (BALL *et al.*, 1994). FECHER e cols. (2007) revisam que, virtualmente, todas as mutações em Ras nos melanomas humanos são da isoforma N-Ras.

Muitos estudos em oncologia investigam a inibição da cascata MAPK em todos os seus níveis, e vários compostos inibidores das quinases Ras e Raf apresentam-se como estratégias terapêuticas atrativas e estão passando atualmente por testes *in vitro* e *in vivo*. Entre estes compostos destacam-se o Sorafenib (inibidor de Raf) e os inibidores das quinases ERK (PD0325901 e ARRY-142886) (RUSSO *et al.*, 2009).

2.2.2 Via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)

Na via PI3K, os lipídios de membrana são convertidos a mensageiros secundários (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, PIP_3) através de sua fosforilação por um membro da família PI3K ativado por receptores tirosina-quinase ou receptores acoplados a proteínas G (Ras), e ativam várias vias efetoras seguintes. A proteína

efetora desta via é conhecida como PKB (Proteína Quinase B) ou Akt, e esta pode atuar em diversos processos biológicos – sobrevivência, progressão do ciclo celular, crescimento e metabolismo – através da fosforilação de vários substratos intracelulares (SHAW e CANTLEY, 2006). A sinalização é terminada pela fosfatase lipídica homóloga a tensina e fosfato (PTEN), uma fosfatase PIP_3 específica, que remove o fosfato na posição 3 do PIP_3, produzindo PIP_2, que não mais serve como sítio de ligação para PKB (NELSON e COX, 2006). A proteína PTEN possui funções como fosfatase lipídica e protéica. Como fosfatase lipídica, além de retirar o fosfato do PIP_3, terminando a sinalização PI3K, também pode induzir aumento nos níveis de p27; como fosfatase protéica, é capaz de desfosforilar os intermediários envolvidos na fosforilação de Ras (WU *et al.*, 2003).

A serina/treonina quinase mTOR é capaz de captar estímulos mitogênicos e nutricionais em células de mamíferos e levedura, e é capaz de controlar o crescimento celular em resposta a estes estímulos. As vias de sinalização que envolvem Ras e PI3K convergem para ativar mTOR, e, no melanoma, podem haver eventos mutacionais em componentes de ambas as vias (SHAW e CANTLEY, 2006). Assim como na via MAPK, estão sendo testados agentes que podem combater a sinalização mediada pela via PI3K. Estes agentes são conhecidos por Temsirolimus (CCI-779) e Everolimus (RAD001) e agem através da inibição de mTOR (RUSSO *et al.*, 2009).

A função de PTEN está perdida em 5-20% das amostras teciduais de melanoma, enquanto que em linhagens celulares de melanoma chega a variar entre 30 a 50%, raramente sendo detectada em estágios iniciais da doença (WU *et al.*, 2003). Além disso, a superexpressão de Akt ocorre em mais de 60% dos casos desta doença, e está associada com a diminuição da atividade da PTEN (STAHL *et al.*, 2004). Entretanto, mutações no gene *PI3KCA,* que codifica para a subunidade catalítica da PI3K, são encontradas somente em 3% dos melanomas metastáticos, e estão correlacionadas com um alto nível de fosforilação de Akt mediada por N-Ras (OMHOLT *et al.*, 2006).

DHAWAN (2002) mostrou que a ativação constitutiva de Akt, embora talvez não seja essencial para a iniciação do melanoma, facilita a progressão do tumor. O autor ainda relacionou a ativação de Akt com o aumento dos níveis do fator de transcrição NF-κB.

2.2.3 Proteína do retinoblastoma (Rb)

A perda de controle do ciclo celular é um aspecto chave na carcinogênese. Células normais possuem potencial proliferativo restrito, regulado por quinases dependentes de ciclina (CDKs), as quais fosforilam diversas proteínas intracelulares (NELSON e COX, 2008), entre elas Rb.

MITCHELL (2006) especifica que as CDKs tornam-se ativas apenas após a formação de complexos com ciclinas específicas, que são proteínas regulatórias cuja concentração varia durante o ciclo celular. As CDKs agem através de várias combinações em pontos específicos do ciclo (NELSON e COX, 2008) sendo que a transição da fase G1 para S é mediada por CDK4 e CDK6/ciclina D. A progressão do ciclo ocorre com a fosforilação e inativação da proteína do retinoblastoma (Rb) pela CDK2/ciclina E, na fase tardia de G_1. (MITCHELL *et al.*, 2006; WEINBERG, 2008).

No início da fase G_1 do ciclo celular, Rb liga-se às proteínas E2F, uma família de fatores de transcrição que controlam a expressão de vários genes envolvidos com a progressão do ciclo celular. A ligação de Rb à E2F leva a inativação desses fatores de transcrição, e a célula fica em estado quiescente. Entretanto, se Rb for fosforilada pela ação da CDK2/ciclina E, ocorre a liberação dos fatores E2F, que ficam livres para ativar seus genes-alvo, permitindo a transcrição de genes que promovem a entrada da célula na fase S do ciclo celular (SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

À medida que as células adentram a fase S, as ciclinas tipo A substituem a ciclina E como parceiras de CDK2. Na fase S tardia, as ciclinas A deixam as CDK2 e associam-se a CDK1. Na entrada da fase G_2, as ciclinas A são substituídas pelas ciclinas tipo B, que no início da fase M desencadeiam os eventos relacionados à mitose (WEINBERG, 2008). O desequilíbrio na atividade das CDKs é uma marca da formação do melanoma (SHARPLESS e CHIN, 2003).

O inibidor de ciclina $p16^{INK4a}$, codificado pelo locus *CDKN2* (também conhecido como *INK4a/ARF*), age através da ligação às quinases dependentes de ciclina CDK-4 e 6, bloqueando sua atividade e prevenindo a fosforilação de Rb, desta forma prevenindo a proliferação celular deletéria e/ou indiscriminada. Em vários tumores, este gene é perdido ou encontra-se mutado (SHARPLESS e CHIN, 2003), sendo que a incidência de mutação no melanoma familiar chega a 36% nas famílias estudadas que

possuem mais de três casos da doença, e diminui para 5% nas famílias que possuem dois casos, mostrando que a prevalência destas mutações aumenta à medida que aumentam o número de casos nas famílias (NEWTON BISHOP *et al.*, 1999). Por seu envolvimento direto no melanoma familiar, o locus *CDKN2* é considerado de alta penetrância para este tumor, e portadores de mutações neste gene são susceptíveis ao desenvolvimento precoce de melanoma, em relação a indivíduos portadores de cópias normais do gene *CDKN2* (revisado por MEYLE e GULDBERG, 2009).

A mutação de *CDKN2* é rara em melanomas esporádicos, estimando-se sua ocorrência em 0,02% dos casos. (BATAILLE, 2000). Na doença esporádica, entretanto, o estudo de MARINI *et al.* (2006) encontrou evidências do silenciamento de *CDKN2* por hipermetilação em 75% dos melanomas primários e 54% dos melanomas metastáticos analisados; este estudo também detectou baixos níveis de expressão de *CDKN2*.

Em melanomas também tem sido observada superexpressão de *CDK6* e amplificação de *CDK4*, porém melanomas com perda homozigótica do gene que codifica o inibidor $p16^{INK4a}$ não demonstram amplificação de *CDK4* (FECHER *et al.*, 2007).

Outros inibidores - $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ e $p57^{Kip2}$ - têm atividade mais ampla, sendo capazes de inibir todos os outros complexos de ciclina-CDKs, pois possuem estruturas que os permitem se ligar tanto à subunidade ciclina quanto à CDK. A atividade destes inibidores está envolvida com sua capacidade de sequestrar as CDKs, mas o aumento da expressão destas pode exaurir os níveis dos inibidores, e a célula sai da quiescência. Além disso, a função catalítica do complexo ciclina-D/CDK, presente no início do ciclo, necessita de sua complexação com subunidades Cip/Kip, demonstrando a duplicidade de função destas proteínas. Na fase inicial da progressão do ciclo celular, estas possuem função estimulatória e na fase final, repressora (SHERR e ROBERTS, 1999; WEINBERG, 2008).

As principais vias de sinalização alteradas no melanoma estão esquematizadas na figura 2.

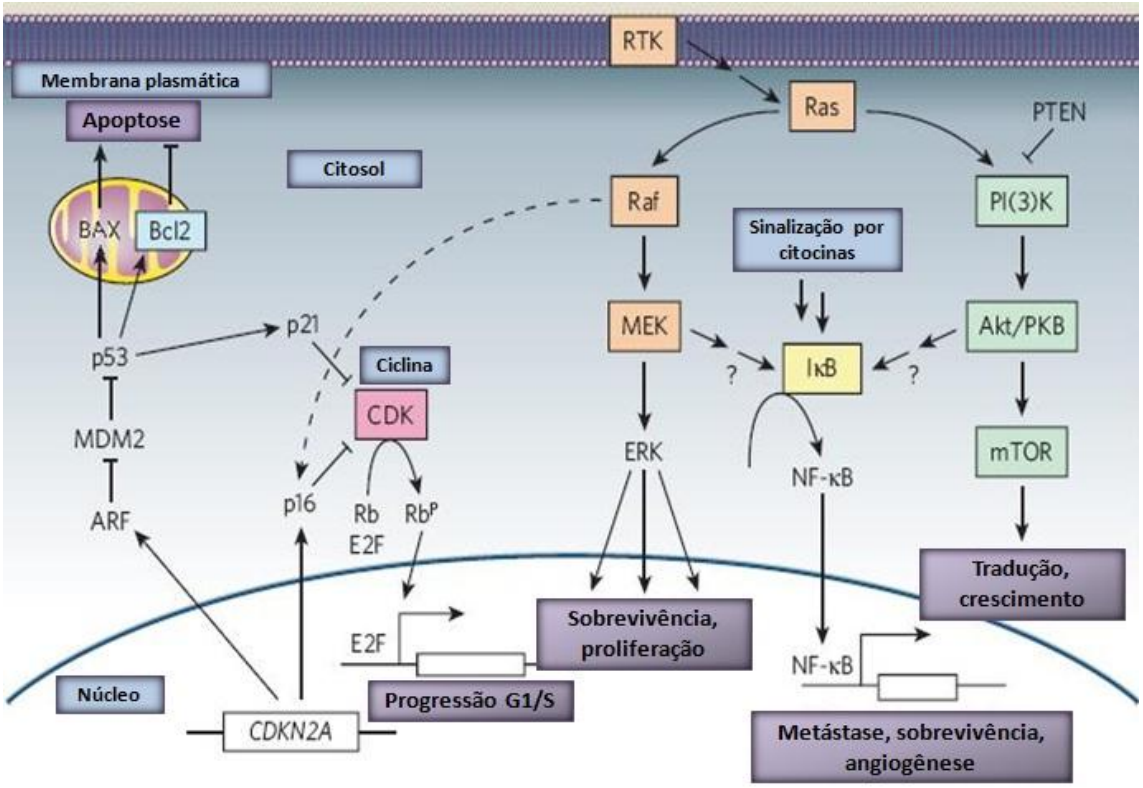


FIGURA 2 – PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MELANOMA

NOTA: Esquema ilustrativo da interação das principais vias de sinalização envolvidas no melanoma. Uma destas vias é a via MAPK, ativada por Ras. Outra via destacada é PI3K, inibida pela fosfatase PTEN. Também é demonstrado o envolvimento da sinalização por NF-κB, que estimula a transcrição de vários genes, incluindo os das metaloproteinases de matriz (MMPs). A sinalização através de $p16^{INK4a}$/Rb e ARF também são importantes, pois sua interrupção pode levar ao desenvolvimento de melanoma, pois os melanócitos ficam impedidos de entrarem em senescência.
FONTE: GRAY-SCHOPFER *et al.* (2007).

2.2.4 Proteínas Rho

As proteínas Rho são GTPases pequenas, que pertencem a superfamília Ras, e participam de várias vias de transdução de sinal, estando envolvidas na reorganização do citoesqueleto de actina, regulação da polaridade celular, transcrição gênica, progressão do ciclo celular, motilidade e atividades enzimáticas (revisado por ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002). Estas proteínas se encontram inativas quando ligadas a GDP, e são ativadas quando este é convertido a GTP, através da ação de GNEFs específicos para Rho, que hidrolisam GTP e transferem um fosfato para a proteína (FIGURA 3). Após exercer sua função, Rho hidrolisa o GTP ligado e fica em seu estado inativo novamente (SYMONS, 2004).

A quinase Rho (ROCK) é um dos mais importantes efetores da sinalização Rho, e possui muitos substratos. ROCK sofre auto-inibição assumindo uma conformação

fechada. A ligação de Rho libera ROCK desta conformação, fazendo-a assumir uma conformação aberta, e desta forma, ativando-a (CHARDIN, 2003).

A ativação efetiva da via MAPK/ERK requer estímulos diretos da sinalização Ras, como já descrito, e evidências suportam que RhoA também é capaz de ativar ERK, através de interações com Ras que são necessárias para a ativação da proteína Raf *in vitro*; foi evidenciado que as GTPases Rho sozinhas não são capazes de ativar Raf, e que, ainda, estas proteínas são capazes de ativar somente Raf associada à membrana, e não a fração citoplasmática (LI *et al.*, 2001). Foi demonstrado por WELSH *et al.* (2001) que Rho pode atuar de diferentes formas no ciclo celular, induzindo ou diminuindo a expressão da ciclina D1. Permitindo a ativação de ERK, e consequentemente, a ativação da ciclina D1, Rho estimula a progressão do ciclo celular. Por outro lado, Rho pode agir na supressão de uma via alternativa dependente da ação de Rac-Cdc42 que também é capaz de induzir a expressão de ciclina D1 durante o início da fase G1 (WELSH *et al*., 2001; COLEMAN e MARSHALL, 2003).

Estas proteínas, principalmente RhoA e RhoC, são importantes na tumorigênese do melanoma e necessitam de isoprenilação pós-traducional (geranilgeranilação ou farnesilação), modificação que assegura sua localização na membrana celular, permitindo sua interação com outras moléculas sinalizadoras e aumentando o potencial invasivo destas células. A inibição da isoprenilação causa o destacamento de Rho da membrana, e esta é liberada para o citoplasma da célula (COLLISSON *et al.*, 2002).

Diferentemente de Ras, não foram detectadas mutações ativadoras de Rho no câncer. Há uma tendência a superexpressão destas proteínas, ou ainda, pode ocorrer uma falha no seu ciclo de ativação/desativação (RUTH *et al.*, 2006). A proteína RhoC está envolvida na formação de metástases em células de melanoma, e células com superexpressão desta proteína tem seu potencial invasivo aumentado (CLARK *et al.*, 2000). Além disso, foi demonstrado por RUTH *et al.* (2006) que a superexpressão de RhoC pode aumentar a ativação de Akt, promovendo invasão através da via PI3K. RhoA também participa da patogênese do melanoma mediando a sinalização realizada pelo Fator de Motilidade Autócrino (AMF) - um potente estimulador da motilidade celular – por mecanismos ainda desconhecidos (TSUTSUMI *et al.*, 2002).

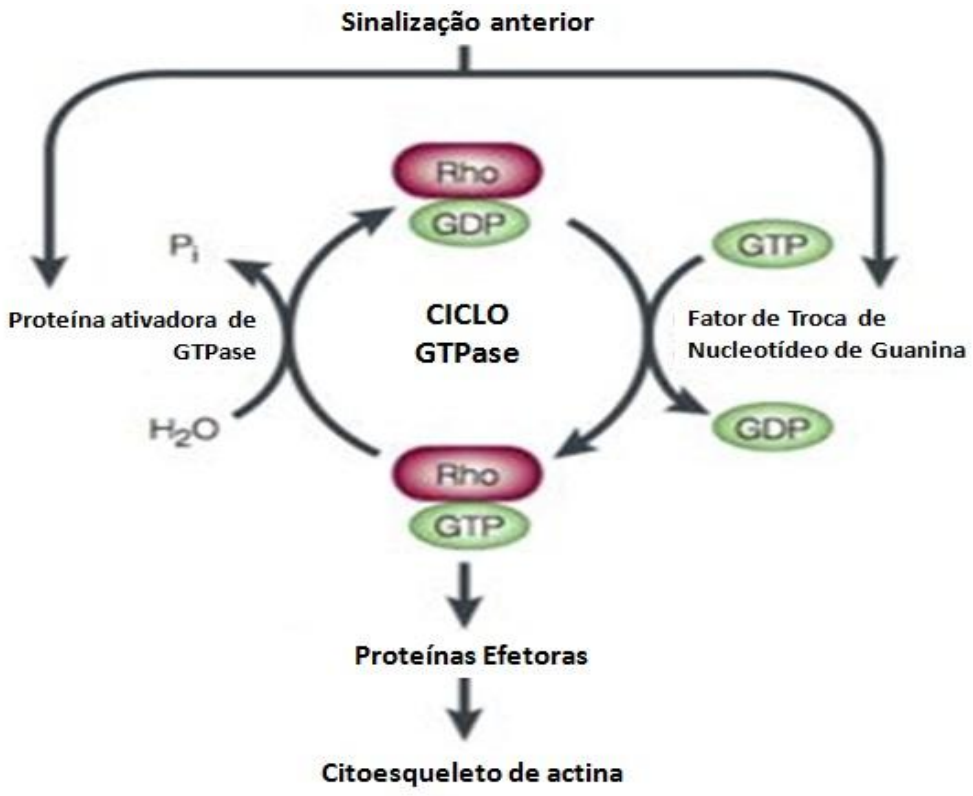


FIGURA 3 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DAS GTPases RHO

NOTA: Esquema de ativação das proteínas Rho, através da troca GDP/GTP. Esta troca é realizada por um Fator de Troca de Nucleotídios de Guanina (GNEF), que hidrolisa o GTP e transfere um fosfato para a proteína, a qual, ativada, pode mudar a conformação da quinase ROCK (não mostrada).
FONTE: http://openwetware.org/images/thumb/7/76/Luo_rho_schem.jpg/300px-Luo_rho_schem.jpg

Os eventos que levam a transformação neoplásica dos melanócitos seguem vias específicas, e possivelmente dependendes da localização do tumor. Estas vias parecem ser variáveis, de acordo com a natureza genética do indivíduo, do microambiente em que o tumor se origina e dos fatores epigenéticos que modulam os eventos transformadores (CROWSON *et al.*, 2007).

Sabendo-se da resistência do melanoma aos mecanismos de indução a apoptose e do seu baixo índice de resposta às abordagens terapêuticas convencionais, e levando em consideração o crescente aumento das informações sobre os mecanismos moleculares que colaboram para a patogênese e manutenção do crescimento tumoral, vários estudos têm procurado e testado compostos que tem como alvo estas vias de sinalização. Estes estudos têm como objetivo fornecer métodos alternativos para o tratamento e a quimioprevenção do melanoma.

2.3 ESTATINAS

2.3.1 Síntese do colesterol

O colesterol pode ser obtido através dos alimentos ou por síntese endógena, sendo o acetato o precursor dos átomos de carbono deste composto. O fígado e os intestinos são responsáveis, cada qual, por cerca de 10% da síntese total. Quase todos os tecidos são capazes de sintetizar colesterol, e o processo ocorre no retículo endoplasmático e no citosol (MURRAY *et al.*, 2007). A via de síntese do colesterol é composta por dezenas de reações, agrupadas em quatro etapas principais. Na primeira etapa, três moléculas de acetato condensam-se, produzindo HMG-CoA, que é reduzido a mevalonato (intermediário com 6 átomos de carbono), em reação catalisada pela HMG-CoA redutase. Esta conversão é decisiva e sem retorno, e a HMG-CoA redutase torna-se, então, o principal ponto de regulação da via, limitando a velocidade da mesma (MARZOCCO e GOMES, 1999; NELSON e COX, 2008; BAYNES e DOMINICZAC, 2007).

Posteriormente, ocorre a conversão do mevalonato a unidade isoprenóide, o isopentenil-pirofosfato, com cinco átomos de carbono. Na terceira etapa, há a polimerização de seis unidades isoprenóides, para formar a estrutura linear (30 carbonos) do esqualeno. Por fim, a conversão do esqualeno em colesterol (27 carbonos) envolve a ciclização do esqualeno, formando os quatro anéis do núcleo esteróide; e vários passos que incluem a perda ou migração de grupos metila e o consumo de O_2 e NADPH (MARZOCCO e GOMES, 1999; NELSON e COX, 2008).

Segundo BAYNES e DOMINICZAC (2007), a síntese da HMG-CoA redutase hepática é estimulada pelo jejum e inibida pela ingestão de colesterol na dieta, sendo que a atividade desta enzima é controlada pela modificação covalente induzida por *feedback* pelo colesterol e por vários hormônios. A insulina e a triiodotironina aumentam a atividade da enzima, já o glucagon e o cortisol diminuem. A atividade da redutase mostra uma variação diurna, atingindo um pico aproximadamente 6 horas após o escurecer e um mínimo cerca de 6 horas após a exposição a luz. O mecanismo de controle nestas circunstâncias é desconhecido, e os fármacos que inibem a HMG-CoA redutase geralmente são administrados à noite para assegurar o efeito máximo (BAYNES e DOMINICZAC, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

2.3.2 Origem e mecanismo de ação das estatinas

As estatinas respondem por uma classe de antilipêmicos descoberta durante um programa de *screening* de produtos naturais originários de *Penicillum citrinum* e *Penicillum brevicompactum*, e exercem seus efeitos através da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima que converte o HMG-CoA a mevalonato (BARREIRO e FRAGA, 2008).

O primeiro produto isolado foi a compactina. Os resultados incentivaram estudos nesta área e, em 1987, pesquisadores isolaram o derivado metilado da compactina, inicialmente chamado de mevilonina, e atualmente conhecido por lovastatina. A sinvastatina é o derivado 2'-metilado da lovastatina, que ingressou no mercado americano em 1992 com o nome de Zocor® (FIGURA 4). Considerando fatores estruturais e a identificação do anel γ-lactônico como principal grupo farmacofórico envolvido no reconhecimento molecular dos inibidores pela HMG-CoA, ocorreu o desenvolvimento de uma segunda geração de estatinas, simplificada em relação à lovastatina, em que o grupo farmacofórico é substituído por um sistema difenilpirrólico. Assim surgiu a atorvastatina (BARREIRO e FRAGA, 2008).

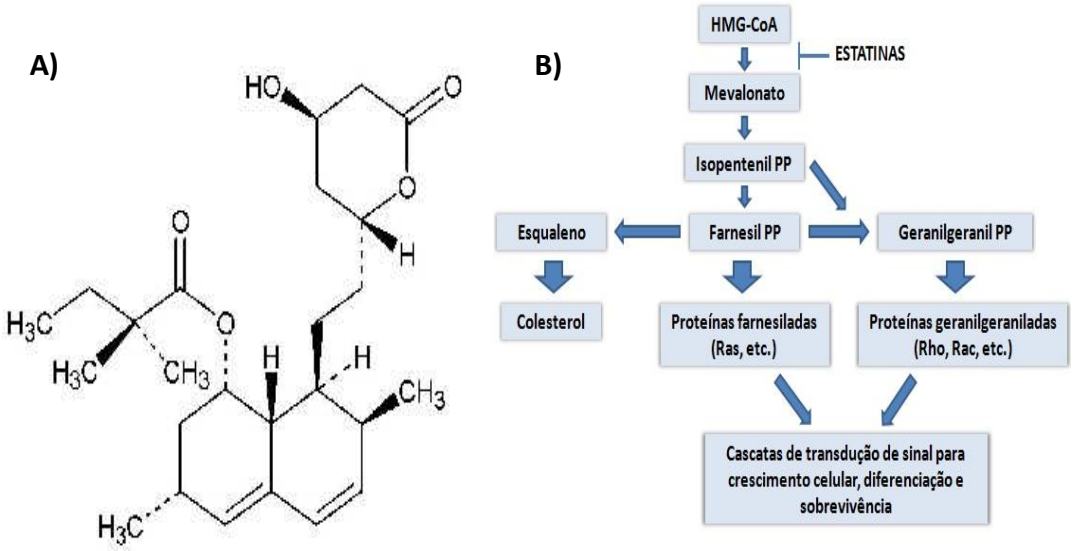


FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SINVASTATINA E SUA AÇÃO NA CASCATA DO MEVALONATO

NOTA: A - Estrutura química da sinvastatina; B – Ação da droga na cascata do mevalonato, inibindo a biossíntese do colesterol, formação de isoprenóides e os processos de sinalização relacionados à prenilação de proteínas como Ras e Rho.

FONTE: SAITO *et al.*, 2008.

Além de inibirem a biossíntese do mevalonato e, consequentemente, diminuírem os níveis de colesterol, as estatinas podem inibir a formação de outros produtos, como os isoprenóides (DEMIERRE *et al.*, 2005). Os isoprenóides, como o geranilgeranil pirofosfato (GGPP) e o farnesil pirofosfato (FPP), podem se ligar a várias proteínas, permitindo sua ancoragem às membranas celulares. A prenilação pós-traducional, como já mencionado, é essencial para a função das proteínas G. Sabe-se que FPP prenila Ras e que GGPP prenila Rho, e isto tem implicações em vários aspectos do controle do crescimento e proliferação celular, e também da apoptose (COLLISSON *et al.*, 2002). A ação global das estatinas na cascata o mevalonato está mostrada na figura 4.

Muitos dos efeitos das estatinas, entretanto, não estão envolvidos à redução dos níveis de colesterol. São relatadas, por exemplo, interações com as integrinas, que funcionam como receptores de superfície transmembrana que se ligam a várias proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno, fibronectina e laminina (TAKEDA *et al.*, 2007). Vários modelos estão sendo propostos para elucidar os demais efeitos observados pelas estatinas. BURKE e colegas (2009) demonstraram que a sinvastatina é capaz de modular a sinalização exercida por TGF-β1 (fator de crescimento tumoral do tipo β1), impedindo assim a ativação de fibroblastos intestinais (fator determinante para a ocorrência de fibrose), e isto ocorre através da interrupção da atividade de Rho/ROCK. Esta interrupção, por sua vez, impede a forforilação de Smad-3, que é o efetor primário das respostas pró-fibróticas ao TGF-β1 (FIGURA 5). Nesse trabalho, entretanto, não foi observada mudança na atividade da via MAPK/ERK.

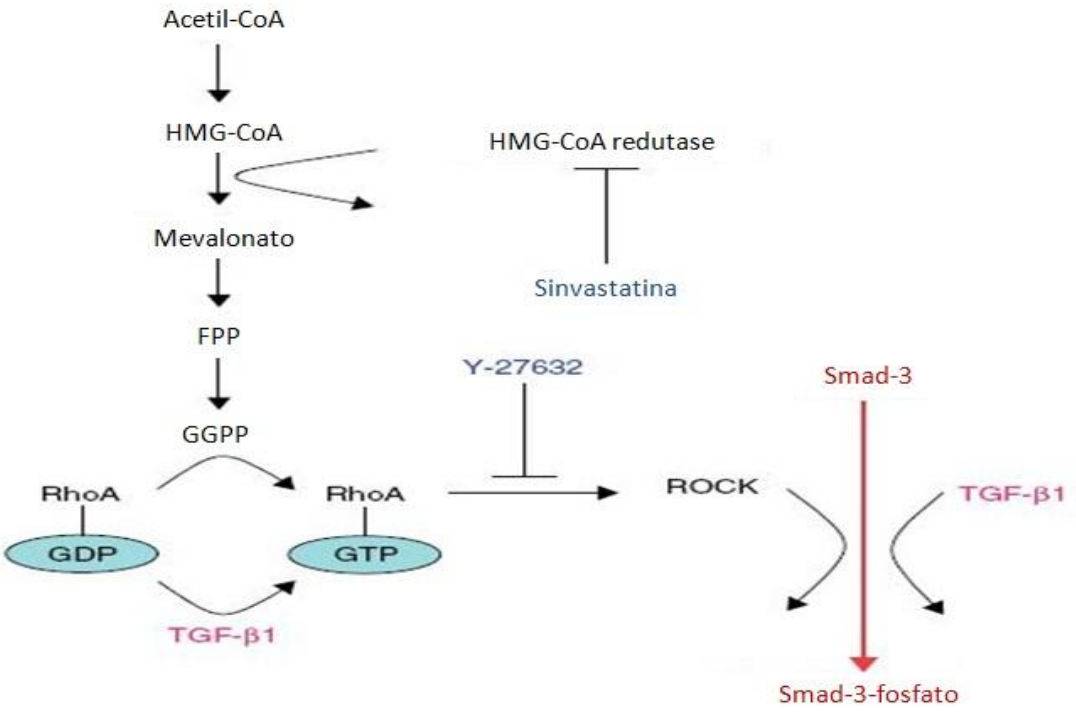


FIGURA 5 – PROPOSTA DE MECANISMO INTRACELULAR DA MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO TGF-β1 MEDIADA POR SINVASTATINA

NOTA: O inibidor da HMG-CoA redutase (sinvastatina) inibe a síntese de intermediários isoprenóides como o FPP e o GGPP, que são necessários para modificação pós-transcricional de GTPases pequenas, como RhoA. Neste estudo, foi demonstrada a redução da ativação de fibroblastos intestinais mediada por TGF-β1 com o pré-tratamento das células com sinvastatina. O mesmo resultado poderia ser obtido utilizando inibidores da sinalização RhoA/ROCK (como Y-27632), mas alguns destes possuem efeitos sistêmicos indesejáveis.

FONTE: BURKE *et al.,* 2009.

2.3.3 Ação antitumoral das estatinas

Em adição ao seu papel original na redução dos níveis de colesterol sérico, as estatinas exercem efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células cancerosas. Os efeitos das estatinas nas células cancerosas podem estar envolvidos com a indução da parada no ciclo celular na fase de transição G_1-S, causada pela inibição da prenilação de proteínas que necessitam desta modificação, tais como Ras (farnesilação) e Rho (geranilgeranilação); os efeitos antiproliferativos também podem ser resultantes do aumento dos níveis de p21 e p27. No caso da indução da apoptose e dos efeitos anti-invasivos, estes parecem ser mediados pela depleção dos níveis de proteínas geranilgeraniladas (CHAN *et al.*, 2003; DEMIERRE *et al.*, 2005).

Vários estudos têm sido realizados utilizando estatinas no tratamento de

células tumorais *in vitro*. TAKEDA *et al.* (2007) demonstraram que a sinvastatina pode suprimir a sobrevivência celular e a atividade invasiva de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço através da inativação da integrina β1, que está relacionada com a cascata de sinalização de ERK. Neste estudo também foi evidenciada a ativação dos inibidores de CDKs, p21 e p27, e da caspase-3, enzima envolvida no processo de apoptose.

Estatinas podem causar mudanças morfológicas e induzir apoptose em linhagens celulares de câncer de cólon, e o mecanismo de ação neste caso está envolvido com a inativação da geranilgeranilação das proteínas RhoA e RhoC, evidenciando-se a diminuição da ligação destas proteínas à membrana. Pode-se observar a inibição da apoptose e das alterações causadas pela droga após a adição de GGPP ou mevalonato (AGARWAL *et al.*, 2002). Evidências também apontam para a ação inibitória das estatinas em linhagens de câncer de mama agressivo. Neste caso, ocorre a inibição da prenilação de RhoA, que causa a inativação de NF-κB de maneira dose-dependente, resultando na diminuição da expressão de metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), diminuindo o potencial invasivo da célula. A adição de GGP – mas não de FPP – foi capaz de reverter o efeito da droga, indicando a ação majoritária de Rho e não de Ras nestas células. O efeito antiproliferativo ocorre através do aumento dos níveis de p21; os autores destacam que a cerivastatina não induz apoptose (DENOYELLE *et al.*, 2001). Em trabalho posterior, confirmou-se a inibição das vias RhoA/ROCK e Rho/AKT, e também foi demonstrada a inibição de ciclina D1 e o aumento de MMP-9 e p21 (DENOYELLE *et al.*, 2003).

Ainda em modelo de câncer de mama, foi demonstrado que a sinvastatina é capaz de induzir apoptose, e que esta é independente da presença/ausência do receptor de estrogênio ou do *status* de expressão de p53 (KOYUTURK *et al.,* 2007). Além disso, observou-se que em células tratadas com a droga por 20h ocorre a ativação (através de JNKs) do fator de transcrição c-Jun, o que também foi demonstrado pelo mesmo autor em modelo de glioma (KOYUTURK *et al.*, 2004).

2.3.4 Efeito das estatinas em células de melanoma

Triagens clínicas controladas do uso de estatinas na prevenção de doença

cardíaca revelaram uma menor incidência de melanoma (e de outros tipos de cânceres) entre as pessoas que ingerem estes medicamentos (DEMIERRE *et al.*, 2005). KOOMEN *et al.* (2007), utilizando informações provenientes de bancos de dados de distribuição de medicamentos e incidência de doenças, nos Países Baixos, analisaram a relação entre o uso de estatinas e a incidência e progressão de melanoma, e revelaram um efeito protetor destas drogas na progressão da doença, com redução da densidade de Breslow. A densidade de Breslow é uma medida de volume tumoral calculada com base na profundidade do tumor a partir da epiderme e do diâmetro, que fornece uma excelente correlação com o prognóstico do paciente: por exemplo, quanto maior o valor da densidade em milímetros, pior o prognóstico (BRESLOW, 1970). Entretanto, a meta-análise sistemática realizada por FREEMAN *et al.* (2006), que incluiu dados de vários trabalhos realizados, não validou a possibilidade das estatinas atuarem na prevenção do melanoma.

Em trabalhos que analisam a ação das estatinas *in vitro* em linhagens celulares de melanoma, os dados indicam a ação antitumoral destas drogas através de vários mecanismos. Foi demonstrado que a sinvastatina é capaz de induzir a apoptose e parada do ciclo celular em diferentes linhagens celulares deste tumor. Ocorreram diminuição da viabilidade celular, mudanças morfológicas (arredondamento pela inibição da isoprenilação de proteínas G reorganizadoras do citoesqueleto), apoptose e parada do ciclo celular, mediada pelo aumento dos níveis de p21 e p27 (SAITO *et al.*, 2008).

Ensaios utilizando a lovastatina demonstraram que esta droga é capaz de induzir a apoptose em células de melanoma representando diferentes estágios de progressão da doença, e acredita-se que esta apoptose seja mediada pela inibição da geranilgeranilação de proteínas Rho (SHELLMAN *et al.*, 2005). COLLISSON *et al.* (2003) testaram os efeitos antitumorais da atorvastatina, estatina de segunda geração, em células de melanoma, demonstrando que esta é capaz de alterar a localização celular das proteínas RhoA e RhoC, removendo-as da membrana celular e, consequentemente atenuando a sinalização mediada por estas proteínas. Além disso, demonstraram inibição da invasão celular e metástase em modelo murino.

GLYNN *et al.* (2008) analisaram os efeitos de quatro estatinas em linhagens

celulares de melanoma. Destas, somente a pravastatina falhou em inibir a proliferação, como também mencionado por SHELLMAN *et al.* (2005). A lovastatina, mevastatina e sinvastatina foram eficientes, inibindo a proliferação em todas as linhagens testadas, sendo a sinvastatina a droga mais potente nesta finalidade. Outros resultados deste estudo incluem a indução de apoptose e a diminuição dos níveis de invasão celular (ambos de maneira dose-dependente). Foram observadas ainda pequenas mudanças na adesão das células a moléculas da matriz extracelular e às integrinas (GLYNN *et al.*, 2008).

Pode ocorrer a reversão dos efeitos inibitórios das estatinas pela adição de GGPP, sugerindo o envolvimento das proteínas Rho preniladas na sinalização dos eventos moleculares de invasão e proliferação (COLLISSON *et al.*, 2003; SHELLMAN *et al.*, 2005; SAITO *et al.*, 2008). Ainda, sugere-se que as doses padrão de estatinas utilizadas para o tratamento da hipercolesterolemia podem não ser suficientes para inibir diretamente a proliferação das células tumorais (GLYNN *et al.*, 2008). A administração de um comprimido de sinvastatina de 40mg por dia garante concentrações plasmáticas equivalentes a aproximadamente 7,2nM em pacientes hipercolesterolêmicos (NAJIB *et al.,* 2003). Em pacientes com linfoma e mieloma, demonstrou-se que a dose máxima tolerada em combinação com o tratamento quimioterápico é de 15mg/quilo/dia, o que sugere que a dose plasmática a ser atingida pode ser ainda maior (VAN DER SPEK *et al*., 2006). No caso da lovastatina, foram acompanhados pacientes com câncer recorrente de células escamosas de cabeça e pescoço, aos quais foram administradas doses de 5 ou 10mg/kg/dia, as doses plasmáticas atingiram picos de 0,2-1,0µM e 0,5-3,5µM, respectivamente (KNOX *et al*., 2001).

2.4 A MATRIZ EXTRACELULAR E AS METALOPROTEINASES DE MATRIZ

2.4.1 A matriz extracelular: estrutura e função

A matriz extracelular (MEC) é uma rede de macromoléculas secretadas, localizadas no espaço extracelular, que estão em contato íntimo com suas células de origem, formando um leito gelatinoso tridimensional (BAYNES e DOMINICZAC, 2007). A quantidade de matriz é variável com o tipo de tecido, e forma um substrato que

fornece as condições adequadas para o crescimento e diferenciação das células dos vários tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

A MEC contém três grupos principais de moléculas biológicas. O primeiro grupo é formado pelas proteínas estruturais, como o colágeno, fibrina e a fibrilina; respondem pelo segundo grupo algumas proteínas especializadas, tais como a fibronectina e a laminina; no terceiro grupo estão os proteoglicanos, que podem ser representados, por exemplo, pela heparana sulfato (MURRAY *et al.*, 2007). Estes componentes podem ainda ser classificados em fibrosos e não-fibrosos (fluidos); as proteínas estruturais e especializadas são consideradas componentes fibrosos e os proteoglicanos e glicosaminoglicanos são considerados componentes fluidos (DE ROBERTIS e HIB, 2001).

DE ROBERTIS e HIB (2001) citam como funções da MEC: dar aos tecidos resistência à compressão e à distensão, constituir um meio pelo qual aportam nutrientes e se eliminam dejetos celulares, prover às células pontos de fixação, ser um meio pelo qual as células migram no deslocamento de um ponto a outro do organismo e, ser um veículo pelo qual chegam os sinais provenientes de outras células.

Dentre todas as funções citadas acima, é de interesse particular neste trabalho que a MEC seja um componente regulador de vários processos de sinalização celular. As proteínas da MEC são constituídas por vários domínios, que podem assumir várias formas e cujas sequências e arranjos são altamente conservados através do plano evolucionário. Alguns destes domínios podem ligar-se a receptores de adesão celular, como por exemplo, as integrinas, que medeiam a adesão célula-matriz e realizam transdução de sinal no interior das células. Entretanto, proteínas solúveis da MEC podem se ligar também a fatores de crescimento solúveis e regular sua distribuição, ativação e apresentação às células (revisado por HYNES, 2009).

2.4.2 Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família multigênica de endopeptidases dependentes de zinco, divididas em cinco subgrupos: colagenases, que são ativas contra colágenos fibrilares; gelatinases, altamente ativas contra colágenos desnaturados; estromalisinas, que degradam componentes não-colágenos;

matrilisinas, caracterizadas pela ausência do domínio hemopexina e metaloproteinases de membrana (MT-MMPs), que são moléculas transmembrana. Estas enzimas podem degradar a maioria dos componentes da MEC e as proteínas conectoras teciduais (VU e WERB, 2000), e sua estrutura e domínios são mostrados na figura 6.

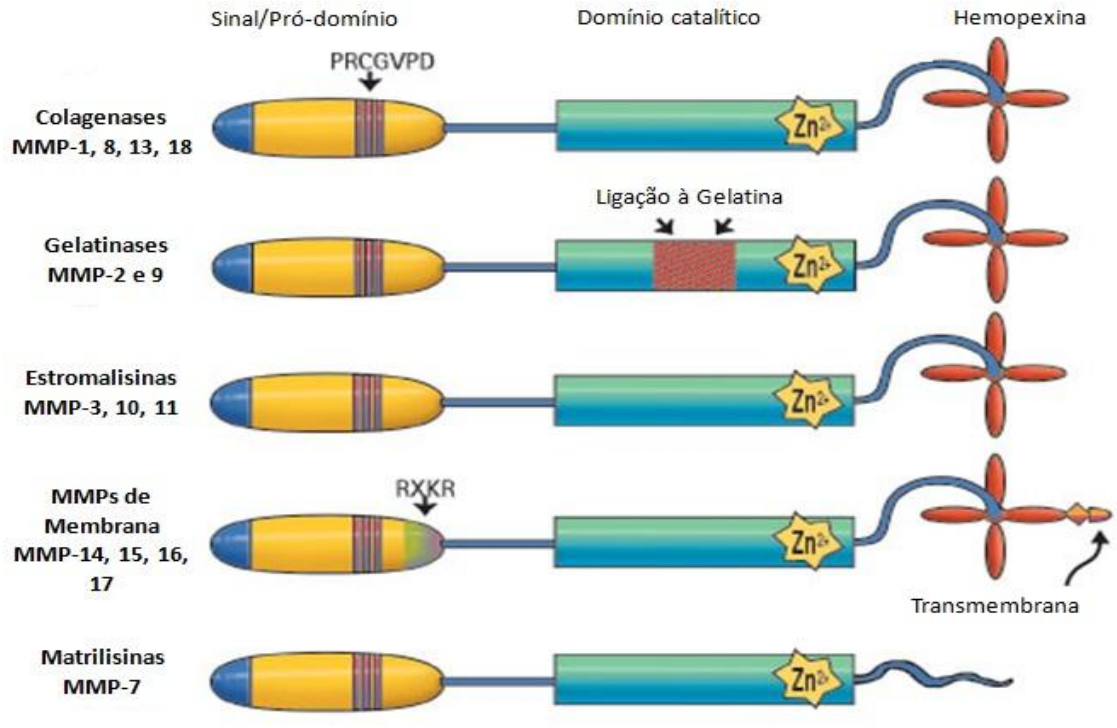


FIGURA 6 – ESTRUTURA E DOMÍNIOS DAS MMPs

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

MMPs são importantes na criação dos microambientes necessários para a embriogênese e desenvolvimento e desempenham papéis em processos fisiológicos, tais como o remodelamento tissular, cicatrização, angiogênese; e em doenças como o ateroma, artrite e ulceração tecidual. Níveis aumentados destas enzimas podem ser detectados em vários tipos de câncer (VISSE e NAGASE, 2003; NAGASE *et al.*, 2006).

As MMPs são sintetizadas como pré-proenzimas (zimogênios) e secretadas das células como pró-MMPs. A ativação das pró-MMPs se dá através de processamento proteolítico realizado por outros membros da família das MMPs (ou auto-

processamento proteolítico), que removem o pró-peptídeo amino-terminal e causam a ruptura da interação Cys-Zn^{2+}, o que permite que uma molécula de água se ligue ao Zn^{2+}, ocasionando a hidrólise (NAGASE e WOESSNER, 1999). Em condições normais a atividade destas enzimas pode ser regulada de diferentes maneiras: controle da transcrição gênica, da ativação dos zimogênios precursores, interação com componentes da MEC e inibição direta da sua atividade enzimática, podendo esta ser realizada pelos inibidores tissulares das metaloproteinases de matriz (TIMPs), inibidores específicos que ligam-se às MMPs numa razão estequiométrica 1:1, e que são os inibidores solúveis clássicos das MMPs, ou por outras proteínas, como por exemplo RECK, que será vista mais adiante (VISSE e NAGASE, 2003). Quatro TIMPs estão bem caracterizados. Estes inibem a atividade das MMPs através da interação do seu resíduo de cisteína da região amino-terminal com o átomo de zinco localizado no sítio ativo da MMP, quelando-o e expelindo a molécula de água (NAGASE *et al.*, 2006).

2.4.2.1 MMPs e estatinas

A ação das estatinas na modulação da expressão das MMPs tem sido descrita em vários tipos celulares. Em células musculares lisas de artérias pulmonares foi demonstrado que a secreção de MMP-2 estimulada pela angiotensina II e pela endotelina através da ativação da via RhoA/ROCK pode ser inibida de maneira dose-dependente pelo pré-tratamento destas células com sinvastatina (LI *et al.*, 2008).

Em miofibroblastos, a secreção de MMPs é mediada pelo TNF-α e resulta no aumento da proliferação destas células, com subsequente remodelamento do miocárdio. A sinvastatina é capaz de reduzir este remodelamento através da interação com o receptor TNF-R1 e pela inibição da secreção de MMP-9 (PORTER *et al.*, 2004). O aumento de MMP-9 também é associado com a hiperplasia da camada íntima da veia safena. O tratamento de culturas de células lisas da veia safena com sinvastatina é capaz de inibir a secreção de MMP-9, pela inativação da via RhoA/ROCK e também diminui os níveis de RNAm de MMP-9 (TURNER *et al.*, 2005).

Apesar de os estudos descreverem vários efeitos das estatinas sobre as MMPs em diferentes tecidos e células, não há descrição sobre o que o tratamento com estatinas poderia causar, em relação a *MMPs* e *RECK*, em células de melanoma.

2.4.2.2 MMPs e melanoma

As principais MMPs estudadas no melanoma são: MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP. A expressão de MMP-2 parece estar correlacionada com a progressão dos melanomas (HOFMANN *et al.*, 1999; REDONDO *et al.*, 2005). Já MT1-MMP pode ser detectada na membrana de células de melanoma com alto e baixo potencial invasivo, e é necessária para a ativação de MMP-2, num processo que depende dos níveis de expressão de TIMP-2; e que tem como pré-requisito a interação das células com componentes da MEC. Células com baixo potencial invasivo expressam mais TIMP-2, o que inibe a ativação de MMP-2 e indica que o excesso de TIMP-2 é capaz de bloquear a ação de MT1-MMP. Em células de melanoma que crescem em monocamada – sem contato com componentes da MEC – a ausência de ativação de próMMP-2 é correlacionada com a produção de MT1-MMP na sua forma não-processada (KURSCHAT *et al.*, 1999).

Em relação a angiogênese tumoral, tanto MT1-MMP como MMP-2 podem ter sua atividade mediada por PI3K, já que a inibição específica de PI3K afetou a atividade de MT1-MMP, consequentemente diminuindo a ativação de MMP-2. Estas MMPs são necessárias para a clivagem de lamininas pró-migratórias, essenciais para a vasculogênese de células de melanoma (HESS *et al.*, 2003).

Ainda, ou adicionalmente, MMP-9 parece ser essencial para o processo de invasão inicial e formação de metástase, e sua expressão foi detectada em todas as amostras de tumores de melanoma metastáticos analisados por REDONDO *et al.* (2005). Porém, outro estudo realizado em modelo de implante xenográfico não detectou expressão de MMP-9, MMP-3 e TIMP-1 nos modelos analisados após a implantação das células nos animais testados (HOFMANN *et al.*, 1999).

Tem sido descrito ainda que MMPs também podem estar envolvidas no processo de morte celular. Em células de melanoma induzidas à apoptose por 2-acetil-furanonaftoquinona (FNQ), observa-se o acúmulo intracelular de MMP-9 ativa e o aumento de expressão de próMMP-2 citosólica. Isto sugere que estas enzimas podem degradar proteínas intracelulares que possuem sequências similares às degradadas na MEC, contribuindo para o destacamento das células. Quando a célula se rompe, entretanto, a liberação destas MMPs pode contribuir para a motilidade e a invasividade de outras células através da MEC (PEREIRA *et al.*, 2005).

Os níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9 não demonstram diferenças entre pacientes com diferentes níveis de progressão do tumor, não sendo considerados marcadores tumorais sensíveis e específicos para melanoma (REDONDO *et al.*, 2005).

2.5 RECK: UM NOVO INIBIDOR DE MMPs

2.5.1 Origem e estrutura

A proteína RECK foi descoberta através do *screening* de uma biblioteca de cDNA de fibroblastos humanos para genes que, quando transfectados em células NIH3T3 transformadas por *v-Ki-ras*, poderiam induzir a reversão do fenótipo maligno (TAKAHASHI *et al.*, 1998; revisado por MENG *et al.*, 2008). O gene que codifica RECK foi localizado no braço curto do cromossomo 9, e sua sequência foi identificada por EISENBERG *et al.* (2002); esta contém 21 éxons e 20 íntrons. A glicoproteína codificada pelo gene *RECK* contém 971 resíduos de aminoácidos, e peso molecular de cerca de 110kDa (TAKAHASHI *et al.*, 1998). A estrutura geral consiste de regiões hidrofóbicas nas extremidades NH_2 e COOH, sendo que esta última permite a ancoragem do glicosilfosfatidilinositol (GPI) à membrana celular, um pedaço de cinco cisteínas repetidas próximo à extremidade NH_2, duas regiões com atividade semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF) no meio da proteína e três regiões semelhantes a domínios com atividade inibidora de serina protease (FIGURA 7 – A). Destas regiões inibidoras de serina proteases, uma é compatível com a sequência consenso do chamado “motivo de Kazal” (TAKAHASHI *et al.*, 1998; revisado por NODA e TAKAHASHI, 2007).

As regiões hidrofóbicas em ambas as extremidades da proteína sugerem que esta é provavelmente exportada ao espaço extracelular e permanece ligada à superfície celular pela âncora GPI. Duas evidências corroboram esta afirmação: (i) a proteína RECK pode ser detectada no sobrenadante das culturas quando as células são tratadas com fosfolipase GPI-específica, e (ii) quando é expressa uma proteína RECK mutante, com ausência do terminal COOH hidrofóbico (NODA *et al.*, 2003).

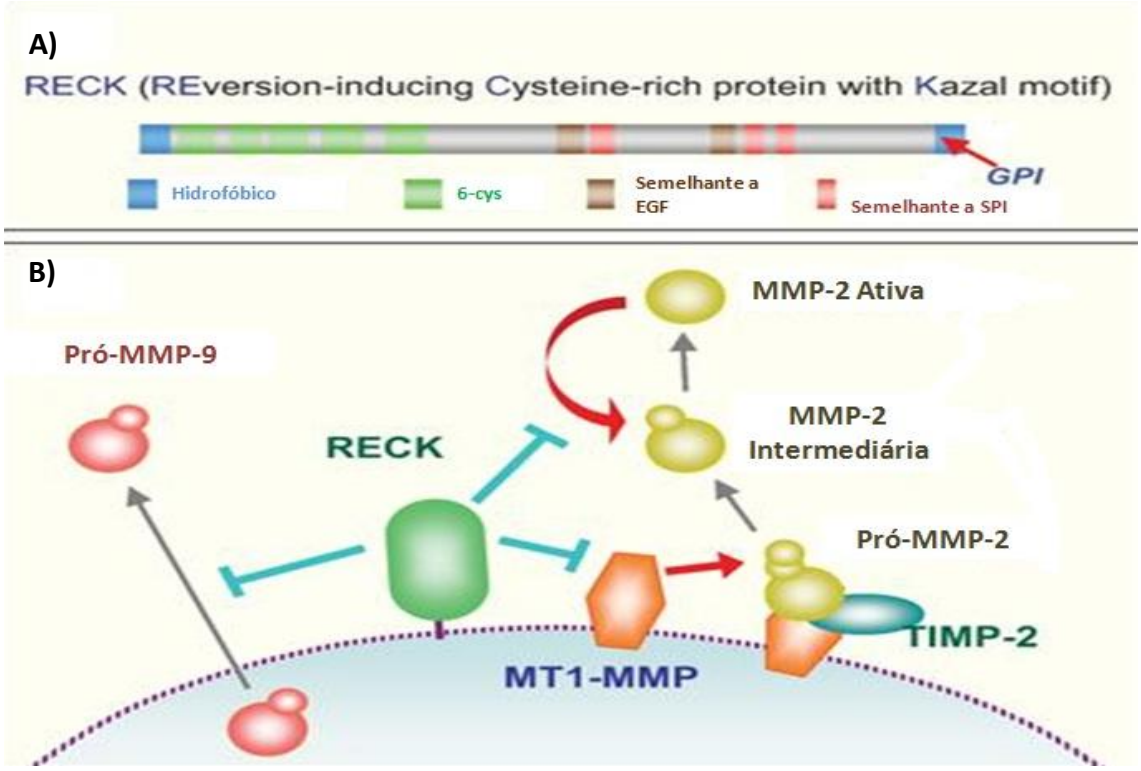


FIGURA 7 – ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DE RECK

NOTA: A – A proteína RECK contém vários motivos, tais como: peptídio-sinal N-terminal, sinal de ancoragem glicofosfatidilinositol (GPI) C-terminal, 6 repetições de cisteína e repetições semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF), além de três motivos semelhantes a inibidores de serina-proteases (um deles correspondendo ao domínio do tipo Kazal). B – O modelo proposto para a ação de RECK envolve a inibição de MMPs através de vários mecanismos, como inibição da transcrição, da ativação e inibição da atividade destas enzimas.
FONTE: NODA e TAKAHASHI (2007).

Baseando-se na sequência predita de aminoácidos sabe-se que a proteína RECK contém cinco sítios de N-glicosilação. Este processo possui várias funções, incluindo a secreção para o espaço extracelular, ativação da proteína e estabilização de glicoproteínas. A glicosilação de RECK não é requerida para sua localização na membrana celular, mas é um fator importante para a supressão da invasão das células tumorais mediada por esta proteína, e o estado de glicosilação da molécula pode ter um papel importante na inibição das MMPs (SIMIZU *et al.*, 2005).

Em recente trabalho de OMURA e colaboradores (2009) estabeleceu-se com sucesso um protocolo para expressão e purificação de proteína RECK recombinante. Ainda, foi demonstrado através de microscopia eletrônica de transmissão e reconstrução por *software* que RECK está presente nas células como um dímero (FIGURA 8), e que este possui uma estrutura tridimensional semelhante a um sino,

além de uma grande cavidade interna. O domínio C-terminal estaria localizado na porção superior deste “sino”, e a molécula seria ancorada à membrana, portanto, com a abertura exposta no lado oposto, o que poderia possibilitar uma maior interação de RECK com outras moléculas próximas à superfície celular.

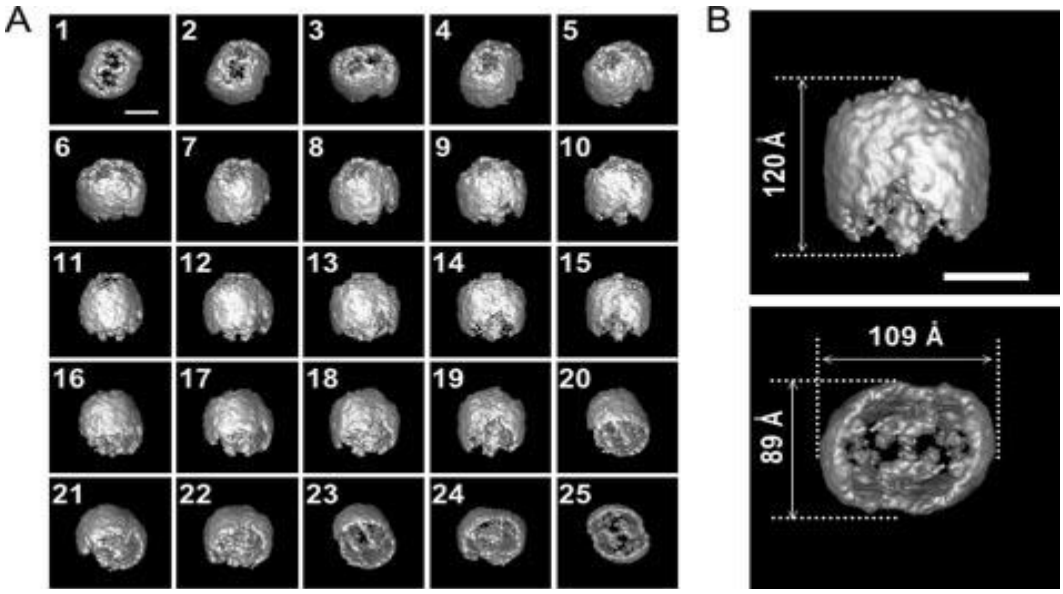


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DO DÍMERO RECK

NOTA: A – A figura mostra a reconstrução gráfica do dímero RECK, vista através de 25 ângulos. A determinação da estrutura tridimensional do dímero RECK foi realizada por microscopia de transmissão eletrônica. B – A figura destaca a forma de “sino” do dímero RECK, sendo que a parte superior seria a parte que fica ancorada á membrana. A abertura ficaria exposta e poderia interagir com várias moléculas próximas à superfície celular.
FONTE: OMURA *et al.,* (2009).

2.5.2 Funções de RECK

Em trabalho pioneiro, TAKAHASHI e colaboradores (1998) descreveram que o gene *RECK* é bastante expresso em tecidos normais, porém, em muitas linhagens celulares tumorais e em fibroblastos transformados por diferentes oncogenes sua expressão está diminuída ou ausente. Entretanto, atualmente, sabe-se que nem todos os tumores ou linhagens celulares tumorais apresentam diminuição dos níveis de *RECK*. Pelo menos 19 linhagens celulares de tumores já demonstraram diminuição ou ausência de RNAm de *RECK*, entre estas: carcinoma de cólon, carcinoma de mama, próstata, osteossarcoma e tumores gástricos (revisado por CLARK *et al,* 2007). Exceções a esta regra estão sendo identificadas, como por exemplo, o carcinoma hepatocelular, em que os níveis de *RECK* são mais altos do que os encontrados no

fígado normal em 40% dos espécimens analisados (FURUMOTO *et al.*, 2001). De maneira similar ao padrão observado no carcinoma hepatocelular, não ocorre redução dos níveis de *RECK* em tumores pancreáticos (MASUI *et al.*, 2003). O painel que se tem atualmente para a modulação da expressão de RECK é que o mesmo seja classificado como um bom indicador prognóstico em vários tipos de câncer, pois em pacientes que apresentam tumores que expressam mais RECK ocorre correlação positiva desta expressão com o aumento da sobrevida dos pacientes (NODA e TAKAHASHI, 2003).

Como função da proteína RECK está estabelecida a inibição das MMPs (FIGURA 7 – B). Foi demonstrado que RECK pode se ligar à MMP-9 e inibir sua atividade proteolítica, sendo que a restauração da expressão de RECK em fibroblastos transformados por oncogenes, como *ras,* também promoveu a diminuição da secreção de MMP-9 (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Segundo OH *et al.* (2001), a proteína RECK recombinante purificada é capaz também de inibir as atividades proteolíticas da MMP-2 e MT1-MMP. Possíveis efeitos de RECK sobre outras MMPs ainda não foram documentados (NODA *et al.*, 2003).

As MMPs, como mencionado anteriormente, são ativas na degradação dos componentes da MEC em estados normais e patológicos. RECK mantém estes processos sob controle e, em sua ausência as MMPs degradam a MEC de maneira descontrolada. RECK é requerido para o desenvolvimento embrionário normal, facilitando o remodelamento tissular ordenado, mantendo íntegra a MEC ao redor dos vasos sanguíneos em formação e do tubo neural (OH *et al.*, 2001; MENG *et al.*, 2008). Embriões nocaute para *RECK* mostraram ruptura dos tecidos mesenquimais e da organogênese, desenvolvendo hemorragias abdominais, e morrendo por volta do décimo dia da fase embrionária. A superexpressão de RECK em células HT1080 limitou a ramificação vascular, suprimindo a angiogênese tumoral (OH *et al.*, 2001).

RECK regula negativamente MMP-9 através de dois mecanismos: supressão da secreção e inibição direta da atividade enzimática (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Recentemente, também foi demonstrado que RECK é capaz de inibir a transcrição de MMP-9, em fibroblastos e células de carcinoma epidermóide, e que o tratamento destas com RNA de interferência para *RECK* é capaz de restaurar os níveis de RNAm de MMP-9. Ainda, neste mesmo trabalho foi descrito que o mecanismo de supressão está

relacionado com a inibição da atividade do promotor do gene de *MMP-9*, pois RECK impede a ligação de fatores de transcrição como Fra-1 e c-Jun ao promotor, através da diminuição da interação destes fatores com o elemento responsivo a 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TRE-1) presente no promotor (TAKAGI *et al.,* 2009). O mecanismo pelo qual RECK medeia este processo é ainda desconhecido.

O processamento de MMP-2, entretanto, ocorre por duas clivagens proteolíticas consecutivas, que ocorrem preferencialmente na membrana plasmática. RECK regula a ativação de próMMP-2 pela inibição de duas enzimas proteolíticas necessárias para este processo, a MT1-MMP e a MMP-2 ativa (OH *et al.*, 2001). RECK inibe diretamente a atividade de MT1-MMP e inibe o processamento proteolítico da próMMP-2, diminuindo assim MMP-2 na forma ativa. Estes dados sugerem que a inibição de RECK contribui para a transformação morfológica das células, pelo menos em parte, através da produção descontrolada destas MMPs (NODA e TAKAHASHI, 2007).

Evidências recentes indicam que RECK não somente inibe a atividade de MMPs no espaço extracelular, mas também pode agir sobre outros possíveis alvos moleculares. Células de adenoma pituitário humano submetidas à superexpressão ou ao silenciamento de *RECK* e analisadas por *microarray* demonstraram que RECK pode aumentar a expressão de latrofilina-2 (componente do processo de transição mesenquimal-epitelial do interior do canal atrioventricular do embrião), do receptor de hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRHR), do fator nuclear 1/A (regulador do gene da glutationa transferase P) e da resistina tipo β (estimulador da secreção de TNF-α e IL-6 por macrófagos) (YOSHIDA, *et al.,* 2008).

Dados adicionais também sugerem que RECK também está envolvido na progressão do ciclo celular. Foi observado que quando fibroblastos de camundongos normais são estimulados com soro, a expressão do gene *RECK* é regulada negativamente (HATTA *et al.,* 2009; WINNISCHOFER, 2005). A superexpressão de *RECK* induz parada de crescimento em G0-G1, provavelmente mediada por aumento nos níveis de p21, retardando a fosforilação de Rb (WINNISCHOFER, 2005).

2.5.3 Mecanismos de controle de *RECK*

2.5.3.1 Inibição de *RECK* por Ras

A expressão de *RECK* pode ser inibida por Ras. Este oncogene pode inibir a transcrição de *RECK*. A região promotora do gene *RECK* contém dois sítios de ligação aos fatores de transcrição da família Sp1, um sítio de ligação à cEBP e um box CAAT. Embora ambos os sítios Sp1 estejam associados com os fatores de transcrição Sp1 e Sp3, a responsividade a Ras parece ser mediada somente por um desses sítios, denominado Sp1B (SASAHARA *et al.*, 1999; SASAHARA *et al.*, 2002).

O fator de transcrição Sp1 ativa a transcrição pela associação com uma das proteínas de ligação TATA (TBP) coativadoras, no complexo TFIID, podendo agir por interação cooperativa consigo mesmo ou com outros fatores de transcrição (SASAHARA *et al.*, 1999a). Sp3 compartilha com Sp1 a mesma seqüência de ligação e foi descrito como um regulador de dupla função, que pode induzir ou inibir a transcrição, dependendo do receptor e do contexto celular (MAJELLO *et al.*, 1997).

Não foi observada diferença na atividade de ligação ao DNA de Sp1/Sp3, visto que a inibição de Sp1 poderia ser causada pela maior ligação de Sp3 ao promotor (SASAHARA *et al.,* 1999b). Dessa forma, é possível que, utilizando diferentes vias, Ras ativada iniba a expressão de *RECK* através da modulação de modificações pós-traducionais de Sp1/Sp3 e afete sua capacidade de ativação. Outra possibilidade é que a sinalização Ras afete a interação entre Sp1/Sp3 e suas proteínas regulatórias (SASAHARA *et al.*, 2002).

A repressão transcricional de *RECK* via *ras* pode ser relacionada com a desacetilação de histonas. A atividade oncogênica de *ras*, provavelmente via fosforilação de ERK, aumenta a ligação de desacetilases de histonas (HDAC) ao sítio Sp1 no promotor de *RECK*, inibindo a transcrição (CHANG *et al.*, 2004). Este estudo também avaliou a função das DNA metiltransferases (DNMTs) na inibição de *RECK* mediada por *ras*, e demonstrou que *ras* aumentou a expressão da DNMT3b através de ERK. Ainda, ocorreu o aumento da ligação de DNMT3b ao promotor de *RECK*, e esta ligação induziu a metilação do promotor.

2.5.3.2 Outras formas de modulação de *RECK*

Outros mecanismos são descritos para a repressão/ativação de RECK. Em células pancreáticas pré-ativadas, RECK é processado pós-traducionalmente, e a sinalização TGF-β1, mediada intracelularmente por proteínas Smad, é capaz de prevenir sua degradação proteolítica (LEE *et al.*, 2008). Ainda em relação à TGF-β1, o estudo de KIM *et al.* (2008) enfatiza que o mesmo está envolvido no aumento dos níveis de proteína RECK, mas não de RNAm, induzido por irradiação-γ, através do aumento da fosforilação de Smad3.

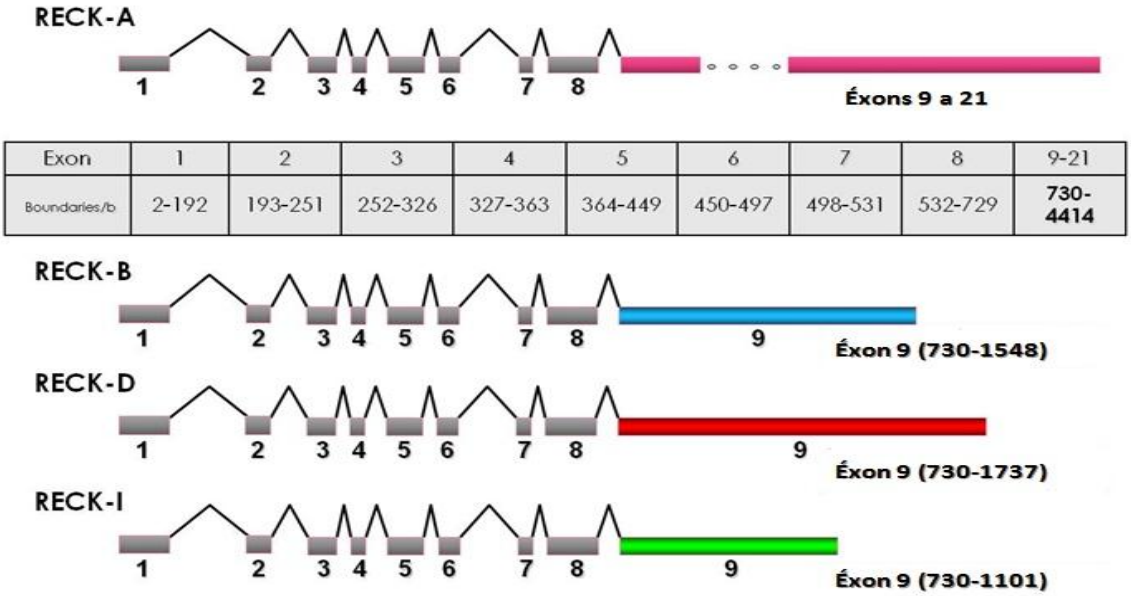
O inibidor tissular de metaloproteinase-2 (TIMP-2) pode aumentar a expressão de RECK através da sinalização mediada por Rap1. A via Rap1 é capaz de enviar sinais para fora da célula através de receptores integrina, aumentado a adesão celular. A superexpressão de Rap1 induzida por TIMP-2 produziu um aumento de três vezes na expressão de RECK, inibindo a migração de células hMVECS (OH *et al.*, 2004).

2.5.4 Isoformas alternativas de RECK

O *splicing* alternativo resulta das variações que podem ocorrer no reconhecimento dos sítios que marcam os éxons e os íntrons, de forma tecido-específica ou de acordo com a fase do desenvolvimento. O processo pode envolver a inclusão ou a remoção de éxons, e é um importante mecanismo regulatório em eucariotos superiores (SCHELLENBERG *et al.*, 2008). Como mencionado anteriormente, a proteína RECK é codificada por um gene localizado no cromossomo 9, composto por 21 éxons e 20 íntrons.

Os transcritos alternativos de *RECK* estão sendo identificados e caracterizados pelo nosso grupo em colaboração com o grupo da Drª Mari Cleide Sogayar, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Neste projeto especificamente, destacamos três destas isoformas, nomeadas RECK-B, RECK-D e RECK-I. Estes transcritos diferem do transcrito canônico (denominado por nós como RECK-A) devido a presença de um éxon 9 alternativo, que é distinto do éxon 9 canônico e também distinto entre os diferentes transcritos alternativos (FIGURA 9).

As proteínas preditas codificadas por estes transcritos estão representadas na figura 10. É interessante notar que, destas isoformas, duas são possivelmente solúveis (RECK-D e RECK-I), enquanto RECK-B, assim como a isoforma canônica, possui a predição de uma âncora GPI C-terminal, permanecendo, desta forma, possivelmente associada à membrana das células. A predição dessas proteínas também prevê a perda dos demais domínios encontrados em RECK-A, exceto as repetições de cisteína localizadas adjacentes à porção N-terminal (LIMA *et al.*, 2009).



Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9-21
Boundaries/b	2-192	193-251	252-326	327-363	364-449	450-497	498-531	532-729	730-4414

FIGURA 9 – ESTRUTURA DO GENE *RECK* E DE SUAS VARIANTES

NOTA: Organização genômica do gene *RECK*. Éxons são representados por caixas e íntrons por linhas. Abaixo da estrutura canônica, estão representadas as variantes de splicing, com as cores destacando as diferenças entre os transcritos. RECK-B, RECK-D e RECK-I possuem um éxon 9 alternativo ao éxon 9 de RECK-A e também distinto entre si.

FONTE: LIMA *et al*. (2009).

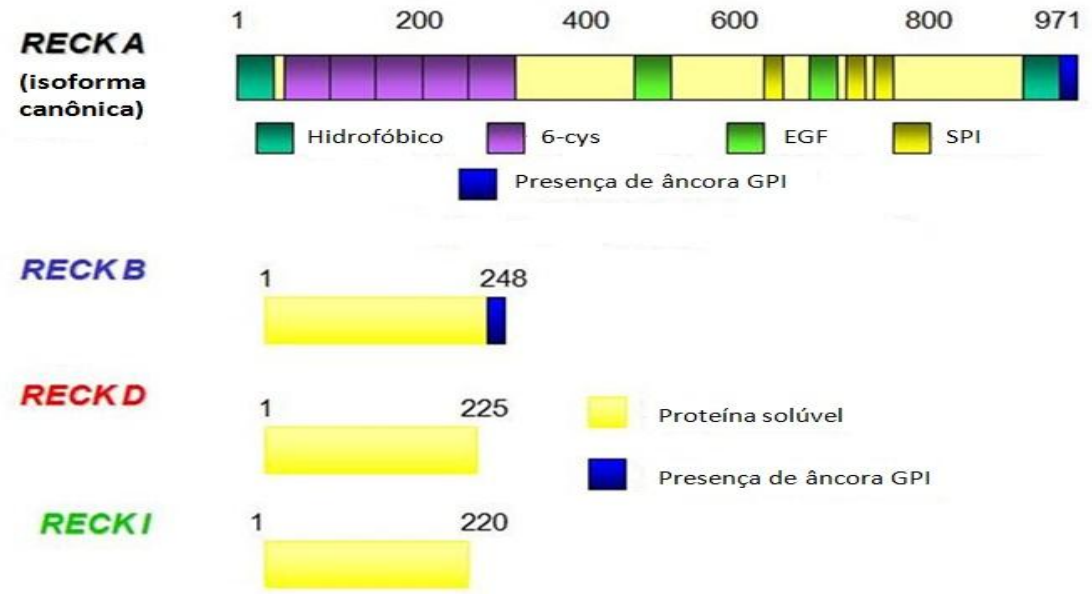


FIGURA 10 – PROTEÍNAS PREDITAS CODIFICADAS PELOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK*

NOTA: Representação esquemática das proteínas preditas codificadas pelas isoformas de *RECK*. Os números dos resíduos de aminoácidos são indicados. As análises foram geradas utilizando os softwares PROSITE e GPISOM. As isoformas alternativas perdem a maioria dos domínios presentes na isoforma canônica, exceto algumas regiões ricas em cisteína. A proteína predita RECK-B contém o sinal para ancoramento por GPI. As proteínas RECK-D e RECK-I seriam solúveis.

FONTE: LIMA, *et al*. (2009).

As características dos transcritos alternativos e das proteínas preditas permitem sugerir que estas podem ter funções distintas da isoforma canônica no contexto celular. Ainda não estão descritas as atividades destas isoformas, e, por isso, justifica-se a investigação da modulação de sua expressão tanto em diferentes tipos celulares, bem como após estímulo com diferentes agentes.

3 JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tipo de tumor altamente resistente às terapias convencionais, especialmente quando se encontra em condições de metástase, o que torna necessário que se busquem novas alternativas de tratamento deste tumor. O processo de metástase, em geral, é facilitado pela ação das metaloproteinases de matriz, que degradam a matriz extracelular, favorecendo a invasão. Entre os elementos que podem regular a atividade das MMPs está RECK, uma glicoproteína ancorada à membrana celular. Tendo em vista que as estatinas são drogas que inibem a síntese de colesterol e isoprenóides (importantes para a ação de proteínas sinalizadoras, incluindo as GTPases Ras e Rho), podendo interferir na composição da membrana das células, e também que vários trabalhos relatam a ação antitumoral destas drogas, inclusive em linhagens celulares de melanoma, este trabalho avaliará o efeito do tratamento de células de melanoma humano com doses variadas de uma estatina (sinvastatina) em relação aos níveis de *RECK*, *MMPs*, *TIMPs* e aos processos de proliferação e viabilidade celular.

Vários estudos têm avaliado os efeitos sinergísticos da sinvastatina, além de sua ação antilipêmica já estabelecida. Sabe-se que esta droga é capaz de inibir a ação das proteínas Rho, e que também pode regular os processos de sinalização mediados por TGF. Neste contexto, é conveniente lembrar que a RECK é inibido por Ras e tem sua ação modulada por TGF-β1. Além disso, RECK promove parada de proliferação celular mediada por p21.

Dessa forma, o objetivo do estudo é avaliar se *RECK* e suas isoformas alternativas de *splicing* são alvos moleculares modulados por simvastatina em modelo de melanoma humano e correlacionar com os níveis de *MMPs* e *TIMPs*, além de examinar os efeitos desta droga na parada da proliferação celular. Para este fim, foi utilizada uma linhagem celular de melanoma humano (SK-MEL 28), tratada com diferentes doses de sinvastatina. A proliferação celular foi avaliada por meio de curva de crescimento, e a progressão do ciclo celular foi estudada através de citometria de fluxo. Para analisar os níveis de RECK e MMPs após o tratamento com a droga foram empregadas técnicas de mensuração dos níveis de RNA mensageiro, proteína e também ensaios de atividade. O estudo dos efeitos biológicos relacionados ao tratamento das células de melanoma com sinvastatina, bem como sua influência sobre

a expressão de *RECK*, suas isoformas alternativas e *MMPs* são importantes para melhorar o entendimento sobre possíveis alvos moleculares com significância clínica na terapia do melanoma.

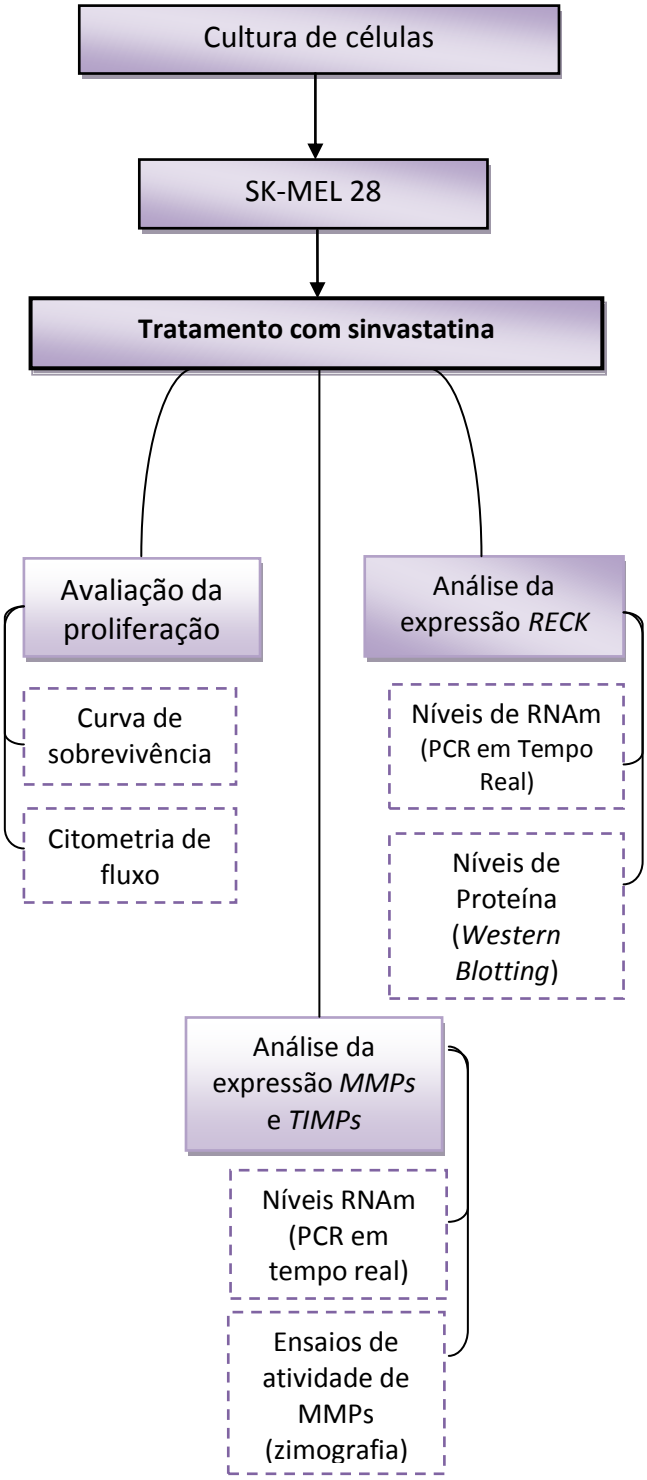
4 OBJETIVOS

Considerando a ação antitumoral das estatinas e o papel de RECK como regulador de MMPs, o objetivo geral deste trabalho é caracterizar a possível modulação do gene *RECK,* bem como de seus transcritos alternativos de *splicing* em linhagens celulares de melanoma humano após o tratamento com sinvastatina e correlacionar os níveis de expressão de *RECK* com o de *MMPs* e *TIMPs* e com o fenótipo apresentado pelas células.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da sinvastatina na proliferação de linhagens celulares de melanoma humano utilizando curva de crescimento;
- Avaliar a indução de apoptose e/ou parada de proliferação mediada pelo fármaco estudado através de citometria de fluxo;
- Analisar a expressão de *RECK* e suas isoformas alternativas, bem como de *MMPs* e *TIMPs* após o tratamento das células SK-MEL 28 com sinvastatina em diferentes doses, avaliando os níveis de RNA, de proteína e realizando ensaios de atividade.

5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR

6.1.2 Esterilização dos materiais

Todos os materiais e vidrarias utilizados para os procedimentos de cultivo de células (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiras plásticas para pipetas automáticas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave da marca Fanem a 120°C, durante 40 minutos e sob pressão de 1atm. Após o processo de esterilização, o material foi colocado para secar em estufa Fanem (Modelo Orion 505) a 50°C.

6.2 SOLUÇÕES, MEIOS DE CULTURA E MATERIAIS

6.2.1 Solução Salina Tamponada (PBS)

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes, sendo que esta solução estoque é constituída por 680 mmol/L de NaCl, 13,4 mmol/L de KCl e 40,5 mmol/L de Na_2HPO_4. Esta também teve seu pH ajustado para 7,4, e foi esterilizada em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente ou a 4°C.

6.2.2 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA é constituída de 137 mmol/L de NaCl, 54 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na_2HPO_4, 0,44 mmol/L de KH_2PO_4, 2,3 mmol/L de $NaHCO_3$, 0,53 mmol/L de EDTA e 50mg/% de tripsina, com o pH ajustado para 7,4. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22µm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a -20°C.

6.2.3 Solução de sinvastatina

A solução estoque de sinvastatina (Zocor®), droga gentilmente cedida pela Merck, encontra-se na concentração de 0,1M, diluída em etanol, e armazenada a temperatura de -70°C. Para os experimentos, realizou-se a diluição da solução estoque em alíquotas nas concentrações de 10mM e 1mM, também diluídas em etanol.

6.2.4 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio RPMI 1640 (Cultilab), reconstituído em água ultrapurificada (MilliQ) e com pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio foi realizado pela adição de $NaHCO_3$ estéril (autoclavado) e o tamponamento do meio foi realizado utilizando HEPES esterilizado por filtração em membrana de aceto-nitrato de celulose com poro de 0,22µm. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de celulose com poro de 0,22µm sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio RPMI 1640 foi suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril (SFB – Cultilab) e 50µg/mL do antibiótico gentamicina (NeoGentamicin – NeoQuímica).

6.2.5 Linhagem celular

A linhagem celular estudada foi a linhagem SK-MEL 28 de melanoma humano maligno (gentilmente cedida pela Profa. Ana Maria de Lauro Castrucci do Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo – São Paulo).

6.2.6 Condições de cultivo

In vitro, as células SK-MEL 28 desenvolvem-se como culturas aderentes cultivadas em garrafas plásticas (poliestireno) estéreis da Techno Plastic Products (TPP). Às garrafas é adicionado o meio de cultura (RPMI 1640) suplementado com 10% de SFB e antibiótico. As células foram mantidas em estufa (Sanyo) sob atmosfera contendo 5% de CO_2 e temperatura de 37°C. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células da garrafa. Para o armazenamento das linhagens, as células, em geral numa quantidade de 10^7 células/mL, foram suspensas em meio de cultura suplementado com 10% SFB e 10% de DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido.

6.2.7 Anticorpos para ensaio de *Western Blotting*

Para o ensaio de *Western Blotting* foram utilizados como anticorpos primários: anticorpo monoclonal anti-RECK feito em camundongo 1:500 (BD Biosciences) e anticorpo monoclonal anti-actina de coelho 1:1000 (Sigma-Aldrich). Como anticorpos

secundários foram utilizados anticorpo caprino IgG anti-rato e anticorpo IgG bovino anti-coelho conjugados com peroxidase (ambos da marca Santa Cruz Biotechnology).

6.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

6.3.1 Curva de sobrevivência: técnica de cristal violeta

Para a curva de crescimento, foram plaqueadas 1,5 x 10^4 células/poço em placas de 24 poços, e as placas foram deixadas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 durante 24 horas para que ocorresse a adesão das células. Após este período, as células foram tratadas com sinvastatina (Zocor®), nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5 e 10µM. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os tempos de tratamento foram de 24, 48 e 72 horas (onde as células ficaram incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO_2), após os quais foi retirado o meio de cultura com a droga, as células foram lavadas com PBS, e posteriormente fixadas com metanol 100% durante 10 minutos. Após este tempo, o metanol foi retirado e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,2% diluída em etanol 2% durante 3 minutos. O cristal violeta cora ácidos nucléicos das células aderidas e fixadas (KUENG *et al.*, 1989). Após 3 minutos, este foi retirado e foram realizadas lavagens com PBS para a remoção do excesso de corante. Após as lavagens, deve-se proceder a eluição do conteúdo aderido às placas com solução de citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} em etanol 50% durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TECAN Infinite 200) utilizando filtro de 540nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100%).

6.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

6.4.1 Microscopia de contraste de fase

Células SK-MEL 28 foram plaqueadas em placas de 24 poços (1,5 x 10^4 células/poço), deixadas em estufa a 37°C, 5%CO_2 durante 24h para aderência e após este tempo, tratadas com 1, 5 e 10µM de sinvastatina. A condição controle corresponde às células tratadas somente com o veículo da droga (etanol). Após 72h de exposição à droga, as células foram analisadas em microscópio de contraste de fase (Olympus CK2) e as imagens foram capturadas com uma câmera digital (SONY). As

imagens obtidas e o aspecto das células submetidas aos tratamentos foram comparados ao aspecto morfológico das células normais da condição controle. Todas as imagens foram capturadas em aumento de 100x.

6.5 ENSAIO PARA ANÁLISE DO CICLO CELULAR

6.5.1 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

As células foram plaqueadas em placas de 60mm em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após adesão, foram tratadas com as concentrações de 0,5, 1, 5 e 10µM de sinvastatina por 72 horas. A seguir, procedeu-se a coleta do material para análise. Primeiramente, coletou-se o meio de cultura (sobrenadante). Após esta retirada do meio, as células aderentes foram lavadas duas vezes com PBS, e o PBS da lavagem foi adicionado ao sobrenadante coletado. A seguir, as células aderentes foram tripsinizadas, e a suspensão de células obtida foi adicionada ao mesmo tubo de coleta anterior. Este material (sobrenadante da cultura + suspensão de células que estavam aderentes) foi centrifugado (2000rpm, 5min), e o sobrenadante foi então descartado, permanecendo apenas o *pellet* de células. O *pellet* foi ressuspenso em 0,5mL PBSA e as células foram fixadas com 4,5mL de etanol 70%, mantido em gelo (nesta etapa as células podem ser estocadas a 4°C por até um mês).

Para análise, as células fixadas foram coletadas e ressuspensas em 1mL de PBS, coradas com iodeto de propídeo. O conteúdo de DNA de cada amostra foi analisado utilizando um Citômetro de Fluxo FC500 (Beckman Counter), adquirindo, para cada análise, 50000 eventos no total, e os dados foram analisados através do programa MXP (*software* padrão do equipamento).

6.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *RECK* (E ISOFORMAS), *TIMPs* E *MMPs*

6.6.1 Análise dos níveis de RNAm após o tratamento com sinvastatina

6.6.1.1 Extração e purificação do RNA total celular e síntese do cDNA

O plaqueamento foi realizado utilizando 1 x 10^6 células por placa em placas P100 (TPP). As células foram incubadas por 24 horas em estufa nas condições de temperatura e atmosfera mencionadas anteriormente, para que ocorra a sua adesão nas placas. Após este tempo as células foram tratadas com as concentrações de 1 e

5µM de sinvastatina e incubadas em estufa novamente durante 72 horas. Após transcorrido o tempo de tratamento, as células foram desprendidas das placas com a solução de tripsina-EDTA (750µL por placa), sendo adicionado cerca de 5mL de meio RPMI para que ficassem em suspensão, e transferidas para tubos Falcon.

As suspensões de células nos tubos foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000*g*, e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado do tubo para não remover o *pellet* de células. Os tubos podem ser armazenados a -70°C até a extração do RNA ser realizada.

Para a extração do RNA celular utilizou-se o kit RNA spin Mini RNA *isolation kit* (Qiagen). Resumidamente, o método consiste em lisar as células pela incubação em solução contendo grandes quantidades de íons caotrópicos. O tampão de lise contém componentes que promovem a inativação de RNAses e cria as condições de ligação que favorecem a adsorção do RNA à membrana de sílica. O DNA contaminante foi removido pela DNAse I (1U/µL). Vários passos de lavagem com tampões removeram sais, metabólitos e componentes celulares macromoleculares. O RNA purificado foi então eluído com água livre de RNAses, podendo ser imediatamente quantificado ou armazenado a -80°C. A quantificação foi feita através de medida de absorbância da amostra em 260 e 280nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific).

Após a extração do RNA total, realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), em reação de PCR seguindo as instruções do fabricante. Utilizou-se 1µg do RNA sintetizado, em reação para volume final de 20µL. O primeiro passo foi a adição de um mix de primer Oligo dT e dNTPs à amostra, após esta adição realizou-se incubação a 65°C durante 5min. Após este tempo, as amostras foram colocadas no gelo por 1min. Para o término da reação foi adicionado à amostra um mix contendo a enzima SuperScript III (200U/µL), RNAse Out (40U/µL), DTT (0,1M), diluídos em tampão oferecido pelo fabricante. As amostras foram incubadas durante 50min, a 50°C, seguida de incubação a 70°C por 15min. Após estas incubações as amostras foram diluídas em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), na concentração final 1:3. O cDNA pode ser armazenado a -80°C. Para as análises de PCR em Tempo Real, as amostras foram novamente diluídas, para uma concentração final 1:30.

6.6.1.2 Análise da modulação da expressão gênica

O passo seguinte é utilizar o cDNA sintetizado para a reação de PCR em Tempo Real, utilizando *primers* específicos para o gene *RECK*, suas isoformas e também para os genes de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP*, bem como os inibidores (*TIMP-1* e *TIMP-2*). Resumidamente, a reação de PCR será realizada em equipamento Rotorgene (Corbett Research) utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). O volume final da reação é de 18µL (4,5µL cDNA + 4,5µL primer + 9µL de SYBR Green). Para realização das reações as amostras foram incubadas a 95°C durante 5min. Após este tempo, foram realizados cerca de 45 ciclos de amplificação para cada gene testado, sendo que as amostras ficaram 10s a 95°C e 20s a 60°C em cada ciclo. A dissociação foi realizada variando-se a temperatura de 60°C a 90°C. Os valores de CT dos genes alvo foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados por genes de controle interno como *hGAPDH* e *hHPRT*. Esta normalização foi realizada pelo software geNorm 3.4 (desenvolvido por VANDESOMPELE *et al.,* 2002).

TABELA 1 – *PRIMERS* UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Gene	Sequência
RECK-A (600nM)	F: 5'-ATGCACTGTATAGACCTCCAGAAGTC-3' R: 5'-CAGTCAATACTAAAGGATGTTCCATGA-3'
RECK-B (600nM)	F: 5'-TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA-3' R: 5'-CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC-3'
RECK-D (600nM)	F: 5'-AATGAGGAACCCAACGGATATGT-3' R: 5'-TCAGGCTCTCTTCTCATTGTTATGACT-3'
RECK-I (600nM)	F: 5'-ATGAGGAACCCAACGGATAGCAG-3' R: 5'-GCCATCTCCTTAGCTCCAGCAGTA-3'
MMP-2 (600nM)	F: 5'-AGCTCCCGGAAAAGATTGATG-3' R: 5'-CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT-3'
MMP-9 (400nM)	F: 5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3' R: 5'-GATTTCGACTCTCCACGCATCT-3'
MT1-MMP (600nM)	F: 5'-GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA-3' R: 5'-TCGAACATTGGCCTTGATCTC-3'
TIMP-1 (600nM)	F: 5'-CCGCAGCGAGGAGTTTCTC-3' R: 5'-GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA-3'
TIMP-2 (600nM)	F: 5'-CGACATTTATGGCAACCCTATCA-3' R: 5'-GCCGTGTAGATAAACTCTATATCC-3'
hGAPDH (600nM)	F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' R: 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
hHPRT (200nM)	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

Primers utilizados para a reação de PCR em Tempo Real. Entre parênteses, a concentração utilizada de cada mix de *primers* F (*forward*) + R (*reverse*).

6.6.2 Extração e quantificação de proteínas

6.6.2.1 Extração de proteínas totais

As células SK-MEL 28 tratadas com sinvastatina nas concentrações de 1 e 5µM por 72 horas foram coletadas e foi adicionado tampão de extração de proteínas RIPA+ (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 2µg/mL Aprotinina, 2µg/mL Pepstatina, 1mM PMSF). As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30min a 4°C, as amostras foram centrifugadas durante 15min a 15000*g* para remoção de fragmentos celulares. O sobrenadante, correspondente à fração de proteínas totais, pode ser armazenado a -80°C. A quantificação das proteínas do lisado foi realizada pelo método de Lowry.

6.6.2.2 *Western Blotting*

Alíquotas com mesma concentração protéica (150µg) às quais foram adicionadas tampão de amostra (Tampão de Amostra Redutor Final 5x: 150 mmol Tris pH 6,8, SDS 10%, Glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, Azul de Bromofenol 0,5%) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 12% e a seguir as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose, através de transferência úmida (300mA, durante 3h, em tampão de transferência 48 mmol Tris, 39 mmol Glicina, 0,037% SDS, 20% metanol, pH 8,3). A eficiência da transferência é monitorada através da visualização do marcador de peso molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker* – Fermentas Life Sciences), transferido do gel para a membrana. Esta visualização foi feita através da coloração da membrana com solução de Ponceau, e a membrana deve ser descorada com tampão TBST.

A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 2h com solução de bloqueio (5% leite em tampão TBST contendo: 5mmol/L Tris-Base, 15mmol/L NaCl, e 0,1% Tween20) a 4°C. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo primário específico anti-RECK humano (1:500, *overnight*, 4°C), e também com anticorpo anti-actina (1:1000, *overnight*, 4°C) e então lavada 3 vezes, 10 minutos cada vez, sob agitação, com TBST. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:5000) por 1h a temperatura ambiente, e então foram lavadas em TBST novamente

por 3 vezes, 10 minutos cada vez, sob agitação. A revelação foi feita utilizando o substrato quimioluminescente ECL (Sigma-Aldrich), em transluminador (UVP Imaging System – programa de captura de imagens: LabWorks), e a determinação das quantidades de proteína presentes nas amostras foi realizada pelo *software* ImageJ 1.38e/Java 1.5 (desenvolvido por Wayne Rasband, e disponível na *web*).

6.6.3 Ensaios de atividade enzimática (MMPs)

6.6.3.1 Zimografia gelatinosa

As células SK-MEL 28 (5 x 10^5 células) foram plaqueadas em placas de 60mm, e incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO_2 durante 24h, para permitir sua adesão a placa. Após 24 horas, foram lavadas três vezes com meio livre de SFB para remover os resíduos de SFB presentes no meio RPMI (10%). Após as lavagens, as células foram tratadas com sinvastatina nas doses de 1µM e 5µM, em meio RPMI suplementado com 0,1% BSA. A condição controle corresponde a células tratadas somente com veículo da droga (etanol), também em meio RPMI 0,1% BSA. Após 72h, este meio de cultura foi coletado e submetido à centrifugação por 15min a 15000*g*.

A quantificação de proteínas do sobrenadante foi realizada pelo método de Lowry. Para eletroforese SDS-PAGE (12% acrilamida e 1mg/mL de gelatina) foram aplicadas 25µg de proteína (às quais foi adicionado tampão de amostra não-redutor) e após a eletroforese, o gel foi incubado em Triton X-100 2,5% durante 1h e então incubado *overnight* em solução tampão 50mmol/L de Tris-HCl (pH 7,5), 200mmol/L NaCl e 10mmol/L de $CaCl_2$ a 37°C. Após esta incubação, o gel foi corado com azul de Coomassie brilhante, e descorado com solução de ácido acético glacial (10%) e metanol (10%).

6.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA). Para a análise de dados em relação a uma variável apenas, utilizou-se a análise de variância dos dados das populações seguido por *t*-test não paramétrico (Mann-Withney *test*). Para análise considerando duas variáveis, os dados foram avaliados por análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey.

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

As células SK-MEL 28 foram plaqueadas e tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina por diferentes períodos de tempo. Após transcorridos os tempos de tratamento, a sobrevivência celular foi avaliada pela técnica de cristal violeta. O resultado está expresso como valor de porcentagem de células em relação ao controle do experimento (células tratadas com veículo somente), considerado como 100%.

Foi observado diminuição do número de células viáveis com o tratamento de sinvastatina na linhagem analisada (FIGURA 11), na qual se observa redução no número de células à medida que se aumenta a concentração aplicada do agente antitumoral, sugerindo efeito dependente de dose. Estes efeitos começam a aparecer após 48h de exposição à droga, e ficam mais pronunciados após 72h. Após 48h de tratamento, observou-se redução da quantidade de células de cerca de 20% em relação ao controle, na dose de 10µM. Após 72h, esta redução na porcentagem de células viáveis chega a 45 e 51%, nas doses de 5 e 10µM, respectivamente (FIGURA 11).

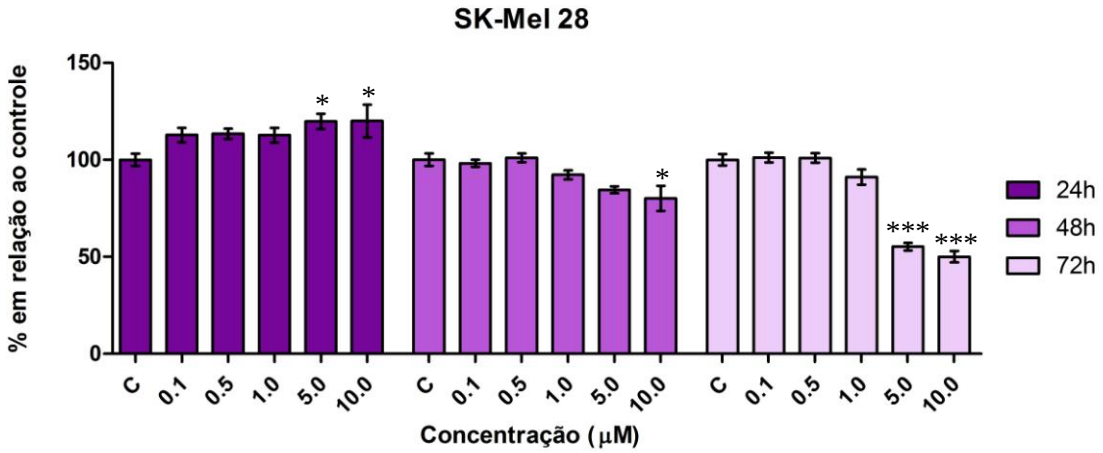


FIGURA 11 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

NOTA: Gráfico da viabilidade das células SK-MEL 28 após tratamento com 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0µM de sinvastatina, após 24, 48 e 72h de exposição. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga: etanol. O resultado é representado pela média ± SEM das porcentagens de células viáveis de três experimentos independentes realizados em triplicata, e cada tempo possui seu controle representado como 100%. As significâncias estatísticas obtidas em relação a cada dose são referentes aos seus controles nos diferentes tempos. One-Way ANOVA. * = $p<0.05$; *** = $p<0.001$.

O aumento do número de células das condições controle nos diferentes tempos (24, 48 e 72h) demonstra regularidade na proliferação celular em relação ao tempo, mostrando a adequação das células às condições do experimento (FIGURA 12 – gráfico inserido).

Analisando-se as curvas de sobrevivência obtidas após 48 e 72h de tratamento em relação às porcentagens de células obtidas encontradas no tempo de 24h, podemos observar que o efeito da sinvastatina nas células de melanoma humano, ocorre de forma dependente de dose e tempo (FIGURA 12).

Em 24h, não se observa nenhum efeito da sinvastatina na redução da viabilidade celular. Analisando-se os dados de forma a tomar como referência o tempo de 24h, e comparando os resultados obtidos em cada dose nos tempos de 48 e 72h, com o resultado da respectiva dose no tempo de 24h, a diminuição do número de células torna-se evidente já na dose de 1µM de sinvastatina. Nesta dose, observa-se uma diminuição da quantidade de células de cerca de 20%, tanto após 48h, quanto após 72h de tratamento, em relação aos resultados obtidos para esta mesma dose no tempo de 24h. Para a dose de 5µM, observa-se redução de 34,5% e de 64%, após 48 e 72h, respectivamente, em relação aos resultados obtidos para esta mesma dose no tempo de 24h. Analisando da mesma maneira, na dose de 10µM observa-se que a o número de células continua a diminuir, sendo que os resultados indicam redução de cerca de 40% após 48h, e 70% após 72h de exposição à sinvastatina (FIGURA 12).

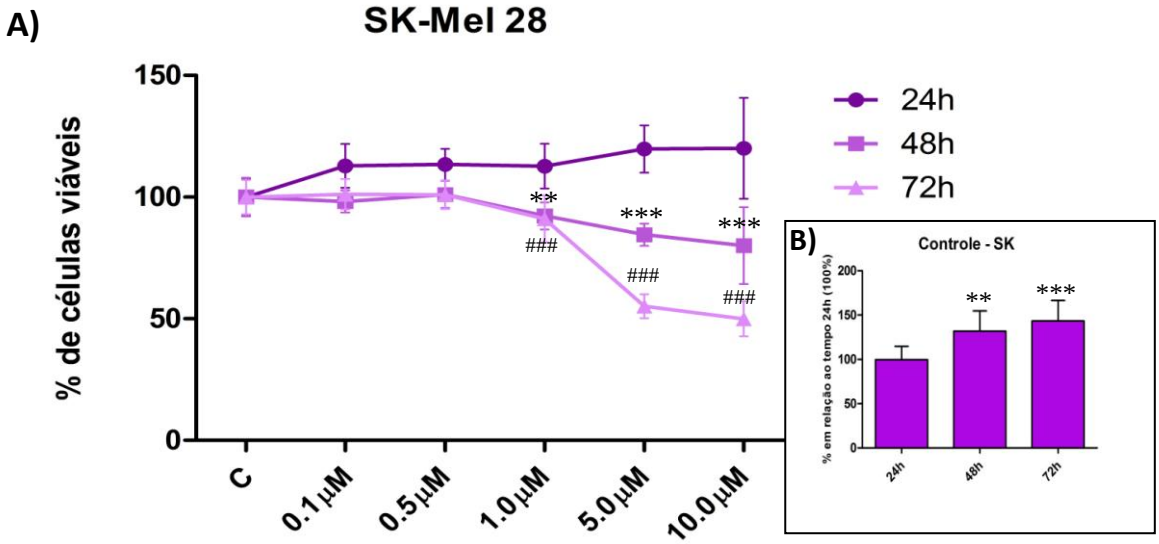


FIGURA 12 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

NOTA: A - Curva de sobrevivência das células SK-MEL 28 após tratamento com diferentes doses de sinvastatina, por 24, 48 e 72h. As condições controle estão representadas como 100% de viabilidade. O resultado é expresso em porcentagem de células viáveis, em relação aos valores médios apresentados pelas triplicatas de cada tratamento. Significância estatística de cada dose é em relação à mesma dose, porém no tempo de 24h. Two-Way ANOVA. ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$; ### = $p<0.001$. B - Gráfico demonstrativo da proliferação dos controles. One-Way ANOVA. ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$.

Em relação ao tempo de exposição, e levando em consideração a responsividade da linhagem à droga, considerou-se o tempo de 72h o mais apropriado para a realização dos ensaios posteriores.

Considerando que após a ingestão da sinvastatina, pacientes em tratamento apresentam níveis plasmáticos condizentes com as menores doses de exposição utilizadas neste estudo, pode-se estabelecer as doses de 1 e 5µM como as que apresentam mais relevância quanto aos resultados obtidos *in vitro*, devido à proximidade dos níveis plasmáticos *in vivo* (KNOX *et al.*, 2001).

7.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

Como mencionado anteriormente, as células SK-MEL 28 crescem como culturas aderentes. Sua morfologia habitual é poligonal, com vários filamentos se originando a partir do citoplasma (FIGURA 13 – A). Originalmente, é uma célula não-melanogênica, cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Através da análise de micrografias, pode-se observar que o tratamento com sinvastatina induz mudanças

morfológicas aparentes nestas células. Após 72h de tratamento com sinvastatina, nas doses de 5µM e 10µM, as células se tornam arredondadas, os filamentos citoplasmáticos desaparecem e as células perdem sua adesão ao substrato de poliestireno (FIGURA 13 - B, C e D). Estas mudanças morfológicas já foram descritas em outras linhagens celulares de melanoma tratadas com sinvastatina e foram atribuídas à reorganização do citoesqueleto de actina, causada pelo desequilíbrio da sinalização mediada principalmente por proteínas Rho (SAITO *et al.,* 2008). Entretanto, outros aspectos resultantes de disfunções em outras vias de sinalização podem ser fatores determinantes para as alterações observadas.

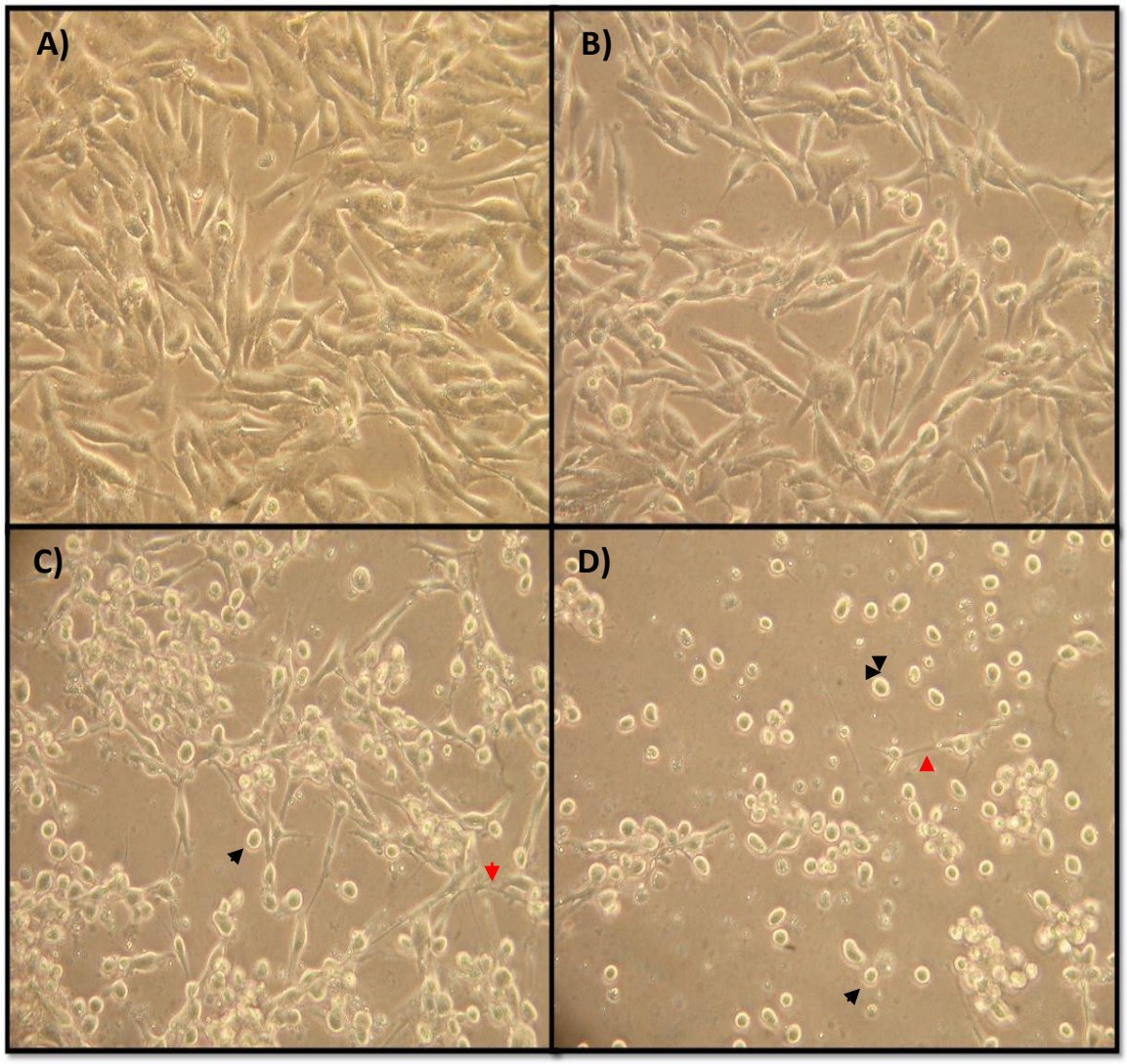


FIGURA 13 – MICROGRAFIAS DE CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA

NOTA: Micrografias das células SK-MEL 28 (aumento de 100x). A – Células tratadas somente com o veículo da droga (controle), apresentando morfologia característica. B – Células tratadas com 1µM de sinvastatina por 72h possuem morfologia semelhante ao controle. C e D – Células tratadas com 5µM e 10µM de sinvastatina por 72h, apresentando alterações morfológicas após o tratamento. As setas pretas indicam células destacadas do substrato, que possuem morfologia arredondada. Em 10µM, poucas células permanecem aderidas, presas somente por finos filamentos do citoplasma (setas vermelhas).

7.3 AVALIAÇÃO DE EFEITOS NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS SK-MEL 28 TRATADAS COM SINVASTATINA

Com base nos dados obtidos após os experimentos de viabilidade celular, decidimos avaliar os efeitos do tratamento com sinvastatina na linhagem estudada, na progressão das diferentes fases do ciclo celular. As células SK-MEL 28 foram plaqueadas e tratadas com sinvastatina em diferentes doses por 72h, como descrito

em materiais e métodos (item 6.4.1). Após este tempo, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo (FIGURA 14).

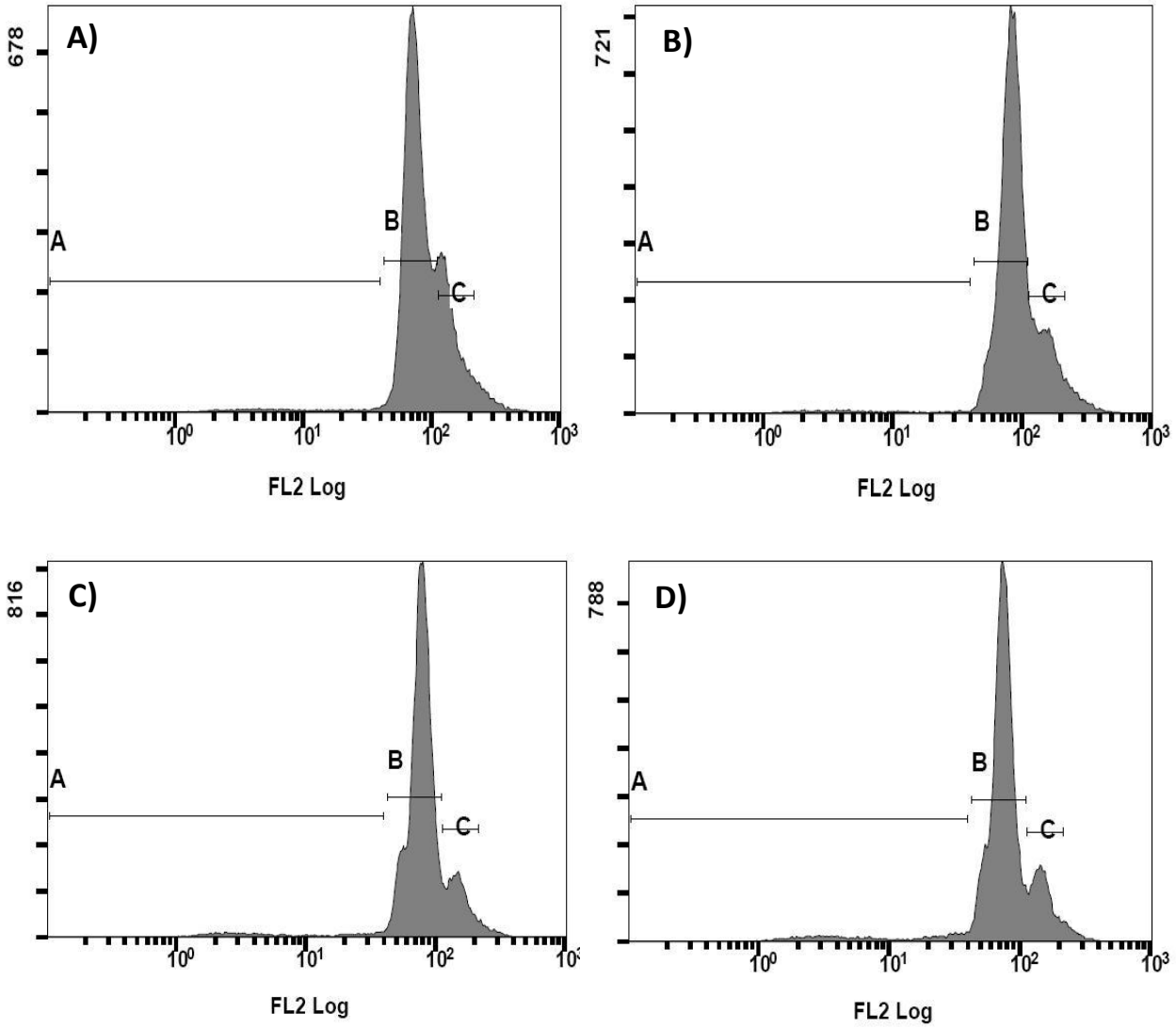


FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA)

NOTA: Histogramas obtidos em citômetro de fluxo. A – Histograma representativo das células tratadas apenas com o veículo da droga (controle). B, C e D – Histogramas representativos das células tratadas com 1µM, 5µM e 10µM de sinvastatina, respectivamente. As regiões delimitadas pelas letras A, B e C nas figuras correspondem a: A – quantidade de células na fase Sub-G1; B – quantidade de células na fase G1 e, C – quantidade de células nas fases S-G2 do ciclo celular.

Os histogramas podem ser delimitados por áreas (no gráfico, representadas pelas letras A, B e C). A intensidade de fluorescência captada na área A corresponde a quantidade de células que se encontram na fase Sub-G1 do ciclo celular, e que são caracterizadas pela fragmentação do seu DNA. O pico correspondente à letra B é

referente às células que estão na fase G1. Por último, o pico representado pela letra C corresponde ao número de células que estão nas fases S e G2 do ciclo celular.

Os resultados obtidos estão representados na tabela 2 e indicam que ocorre diminuição na quantidade de células que estão progredindo no ciclo celular após o tratamento com sinvastatina. Foi observado um aumento da população de células na fase G1 do ciclo celular, com concomitante diminuição na porcentagem de células nas fases S-G2, após o tratamento com o agente antitumoral. Cerca de 67% das células tratadas somente com o veículo da droga apresentam-se na fase G1 (condição controle); esta porcentagem aumenta para 73%, quando as células são tratadas com 10µM de sinvastatina. Este resultado é acompanhado pela diminuição da proporção de células na fase S-G2 de 22% (controle), para 14,45 e 14,85%, nas doses de 5 e 10µM de sinvastatina, respectivamente. Além disso, pode-se observar que, na dose de 10µM de sinvastatina ocorre a duplicação da porcentagem de células na fase Sub-G1 (que corresponde a células com DNA fragmentado), de 3,86% para 8,44%, em relação ao controle. É importante frisar que a diminuição das células em progressão no ciclo celular e a fragmentação das células ocorre de maneira dependente da dose administrada, o que é visualizado pelo gráfico a seguir (FIGURA 15).

TABELA 2 – PORCENTAGENS DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS 72h DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA

Fases do Ciclo	**Concentração de sinvastatina**				
	Controle	0,5µM	1µM	5µM	10µM
G1	67,23 ± 1,49	66,69 ± 0,25	69,12 ± 2,50	78,69 ± 2,00	73,49 ± 0,47
S-G2	22,69 ± 1,20	22,10 ± 1,70	20,57 ± 1,91	16,33 ± 1,04	14,86 ± 0,49
Sub-G1	3,86 ± 0,40	4,23 ± 1,07	4,53 ± 0,44	5,72 ± 0,62	8,45 ± 0,19

Resultados indicativos das médias das replicatas de cada tratamento ±DP.

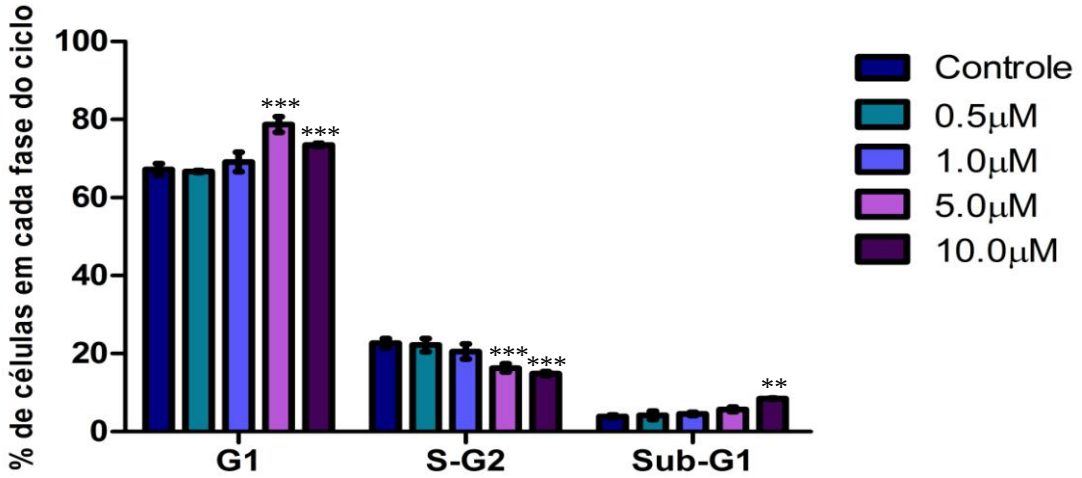


FIGURA 15 – PORCENTAGENS DE CÉLULAS SK-MEL 28 NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS 72h DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA
NOTA: Gráfico representativo dos dados apresentados na TABELA 2. Two-Way ANOVA. ** = p<0.01; *** = p<0.001.

7.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DE *RECK* E SEUS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *SPLICING* EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

Células de melanoma humano (SK-MEL 28) foram plaqueadas e tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina por 72h para a realização de ensaios de expressão gênica. Como controle, foi utilizado novamente células tratadas somente com o veículo da droga (etanol). Após 72h de tratamento as células foram então coletadas, lisadas e o RNA total foi extraído (segundo metodogia apresentada no item 6.5.1.1 de Materiais e Métodos). Após a extração do RNA, foi realizada a síntese do cDNA, através de reação com enzima transcriptase reversa. O cDNA foi então submetido a reação de PCR em Tempo Real, onde foram utilizados *primers* específicos para o gene *RECK* humano, bem como para seus transcritos alternativos de *splicing*, ocorrendo a amplificação somente do gene desejado. Os dados relativos à expressão de *RECK* (transcritos A (forma canônica), B, D, e I) foram normalizados em relação à expressão de dois genes de expressão constitutiva: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*hHPRT*), gene constitutivamente ativo que codifica a sequência para uma enzima do metabolismo das purinas, e também em relação a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), gene constitutivamente ativo da via glicolítica, utilizados aqui como controles internos do experimento. As amostras foram normalizadas em relação a estes dois genes controle através do *software* geNorm VBA

3.4, para Microsoft Excel.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com sinvastatina não afeta os níveis do transcrito da isoforma canônica de *RECK* – RECK-A (FIGURA 16 – A). Após o tratamento das células com as doses de 1µM e 5µM da droga não são observadas alterações nos níveis de transcritos com significância estatística em relação aos níveis da condição controle.

Para o transcrito B de *RECK* (FIGURA 16 – B) foi verificado que o tratamento das células SK-MEL 28 com sinvastatina nas doses de 1µM e 5µM promoveu uma diminuição estatisticamente significativa na sua expressão, em relação ao controle. Este efeito parece ser dependente da dose administrada.

A expressão dos transcritos D e I de *RECK* em células SK-MEL-28 (FIGURA 16 – C e D) não se altera após o tratamento com sinvastatina, em nenhuma das doses aplicadas. É importante lembrar que, diferentemente da forma canônica e da isoforma RECK-B, estas outras isoformas seriam solúveis.

A seguir estão apresentados graficamente os resultados relativos de expressão das diferentes transcritos de *RECK* em células SK-MEL 28 após o tratamento com sinvastatina em relação à condição controle (FIGURA 16).

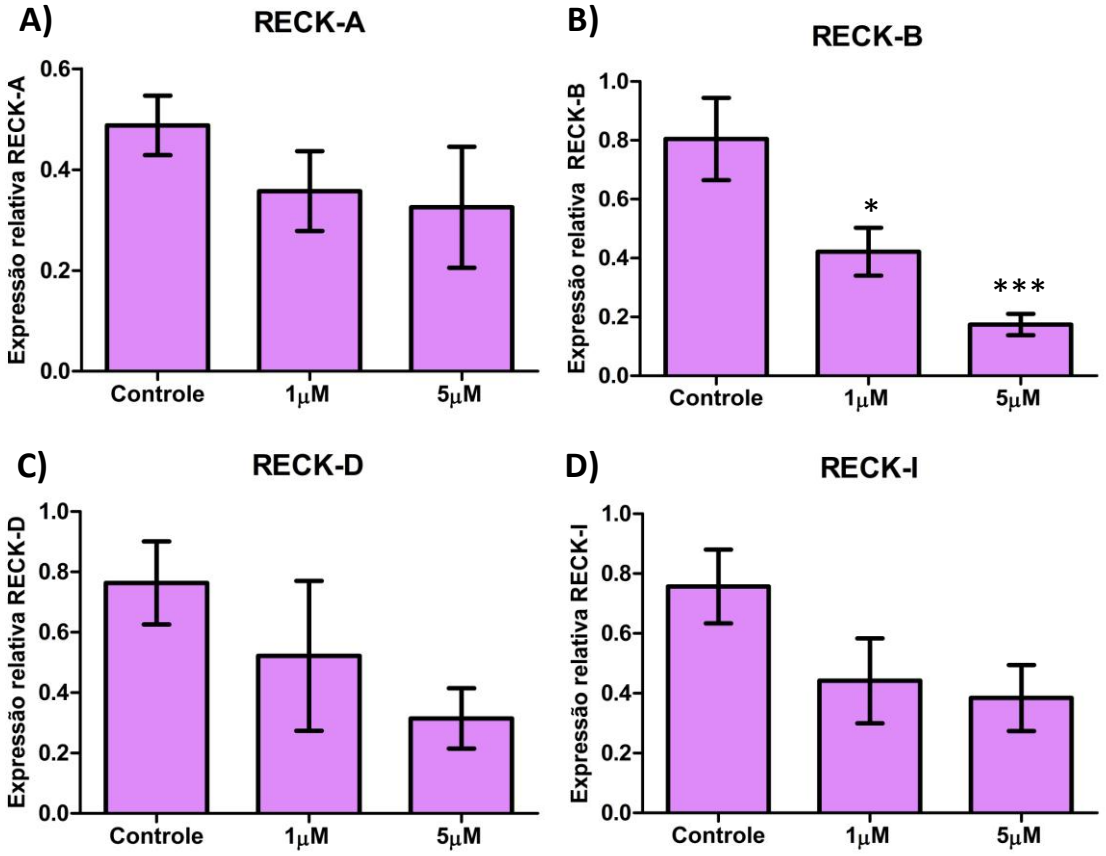


FIGURA 16 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DIFERENTES TRANSCRITOS DE *RECK* EM CÉLULAS SK-MEL 28 FRENTE AO TRATAMENTO COM SINVASTATINA

NOTA: Expressão relativa dos transcritos A, B, D e I de *RECK* em células SK-MEL 28 após 72h de tratamento com 1μM e 5μM de sinvastatina. As condições controle são referentes às células tratadas somente com o veículo da droga. Os resultados representam média ± SEM de quatro experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de cada um dos transcritos frente à expressão dos genes controle (hGAPDH e hHPRT). One Way ANOVA, B) *= p<0,05; *** = p<0,001.

Analisados em conjunto, estes resultados indicam que não ocorre modulação de expressão do transcrito canônico de *RECK*, enquanto que a isoforma B apresenta diminuição dos níveis de RNAm após o tratamento com sinvastatina. É notável que RECK-B pode estar, assim como RECK-A, ancorada à membrana por uma âncora GPI. Pode-se inferir que, apesar desta semelhança estrutural, RECK-B seja regulado de maneira diferente de RECK-A no interior das células, e ainda, que esta isoforma pode exercer uma função distinta à da forma canônica em células de melanoma humano. A ausência de modulação nos níveis de RNAm que codificam para as isoformas solúveis (RECK-D e I) corrobora esta hipótese.

7.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DE *MMPs* E SEUS INIBIDORES CLÁSSICOS (*TIMPs*) EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

Células SK-MEL 28 foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos anteriormente de plaqueamento, coleta de células, lise e extração do RNA total, síntese do cDNA e reação de PCR em Tempo Real (ver Materiais e Métodos item 6.6.1) para análise dos níveis de RNAm de *MMPs* e de seus inibidores clássicos solúveis (*TIMPs*). As células foram tratadas com 1 e 5µM de sinvastatina pelo tempo de 72h. Novamente, a condição controle refere-se a células tratadas somente com o veículo da droga (etanol).

A figura 17 mostra que não ocorre modulação da expressão de *MMP-2*, *MT1-MMP* e *MMP-9* após o tratamento das células SK-MEL 28 com sinvastatina. Há uma tendência clara à diminuição da expressão destas *MMPs*, mas esta diminuição não é significativamente estatística. Para *MMP-2*, ainda, ocorre uma variação atípica nos resultados obtidos das diferentes replicatas, o que persistiu após a repetição dos experimentos. É importante frisar que esta variação ocorre somente nas reações de PCR em Tempo Real específicas para *MMP-2*, e que os outros genes testados não apresentam este comportamento, e que justamente, esta variação poderá estar mascarando uma possível diminuição significativa dos níveis de RNAm de *MMP-2*.

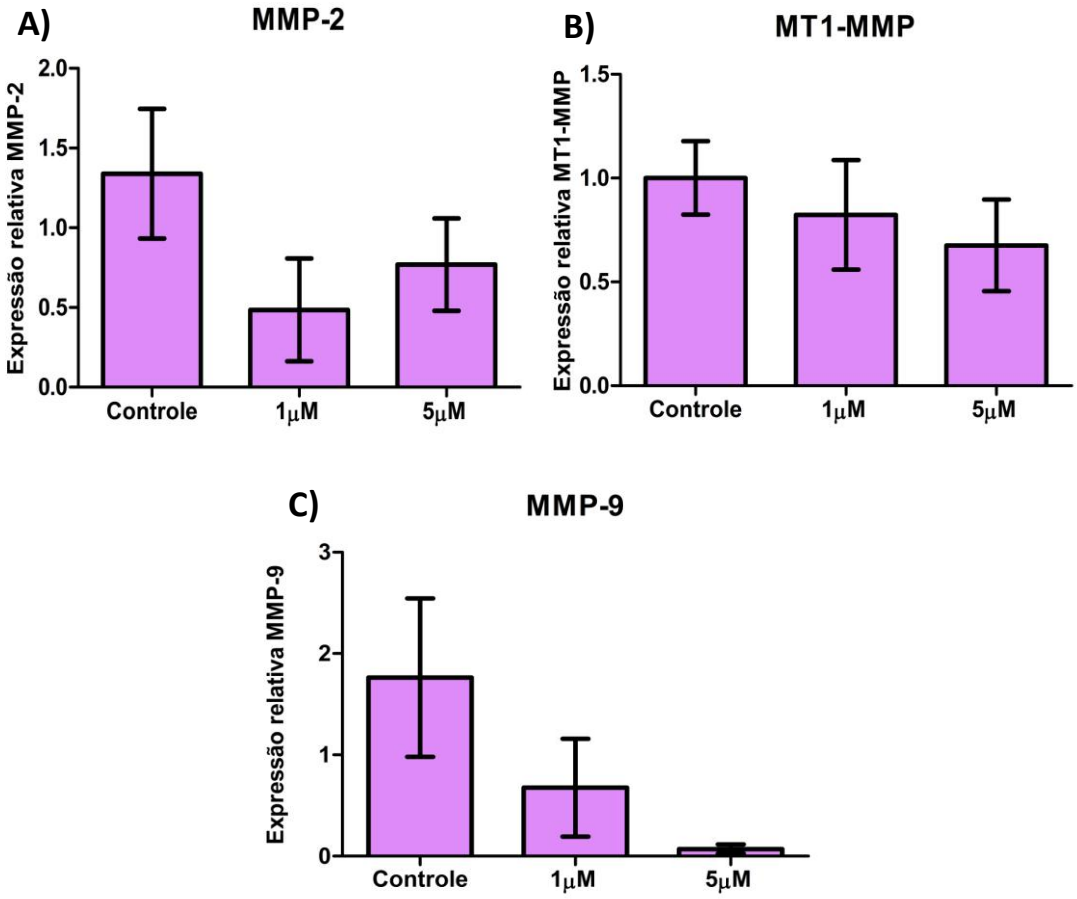


FIGURA 17 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE *MMPs* EM CÉLULAS SK-MEL 28 TRATADAS COM SINVASTATINA

NOTA: Expressão relativa de *MMP-2*, *MT1-MMP* e *MMP-9* em células SK-MEL 28 após 72h de tratamento com 1μM e 5μM de sinvastatina. As condições controle são referentes às células tratadas somente com o veículo da droga. Os resultados representam média ± SEM de quatro experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa destes genes frente à expressão do genes controle (hGAPDH e hHPRT).

Os inibidores clássicos solúveis das MMPs – TIMPs – demonstram comportamento similar frente à exposição à sinvastatina. Não ocorre alteração significativa dos níveis de RNAm de *TIMP-1* após o tratamento com sinvastatina. Embora seja perceptível na representação gráfica o leve decréscimo da expressão de *TIMP-1* na dose de 5μM, este não é estatisticamente significativo. Para *TIMP-2*, na dose de 1μM não é evidenciada alteração de expressão, porém com tratamento de 5μM de sinvastatina ocorre a diminuição estatisticamente significativa da quantidade de RNAm para *TIMP-2* expressa nas células SK-MEL 28.

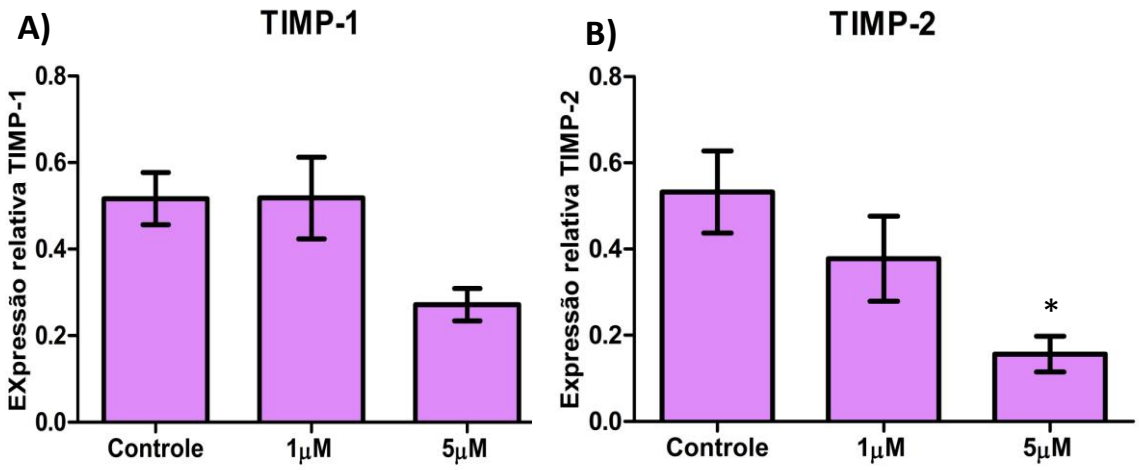


FIGURA 18 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE *TIMPs* EM CÉLULAS SK-MEL 28 TRATADAS COM SINVASTATINA

NOTA: Expressão relativa de *TIMP-1* e *TIMP-2* em células SK-MEL 28 após 72h de tratamento com 1μM e 5μM de sinvastatina. As condições controle são referentes às células tratadas somente com o veículo da droga. Os resultados representam média ± SEM de quatro experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa destes genes frente à expressão dos genes controle (GAPDH e hHPRT). One Way ANOVA, B) *= $p<0,05$.

Estes resultados, se analisados num contexto, corroboram a ação antitumoral da sinvastatina em células de melanoma. O tratamento com sinvastatina aparentemente não modula a expressão de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP*, porém é observada a tendência à diminuição da expressão destes genes. Também não ocorrem alterações nos níveis de RNAm de *TIMP-1*, mas é evidenciada a diminuição na expressão de TIMP-2 após tratamento com 5μM de sinvastatina.

7.6 ANÁLISE DAS RAZÕES INIBIDORES/MMPs

O equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores pode ser demonstrado pela razão entre o inibidor e a MMP. Se o valor da razão estiver perto, ou for igual a 1, tem-se um equilíbrio entre as quantidades de inibidor e MMP. As razões de *RECK/MMPs* e de *TIMPs/MMPs* são demonstradas nas tabelas, e a representação gráfica está demonstrada nas figuras.

TABELA 3 – RAZÃO INIBIDOR/*MMP-2*

	RECK-A	RECK-B	RECK-D	RECK-I	TIMP-1	TIMP-2
C	0,48 ± 0,11	0,74 ± 0,13	1,42 ± 0,17	1,40 ± 0,23	1,54 ± 0,55	1,44 ± 0,50
1μM	2,22 ± 0,56	2,94 ± 0,91	2,36 ± 1,06	1,73 ± 0,42	1,58 ± 0,95	0,81 ± 0,42
5μM	0,59 ± 0,21	0,46 ± 0,24	0,66 ± 0,37	0,76 ± 0,32	0,80 ± 0,19	0,56 ± 0,19

Resultados indicam média das razões ± SEM de quatro experimentos independentes.

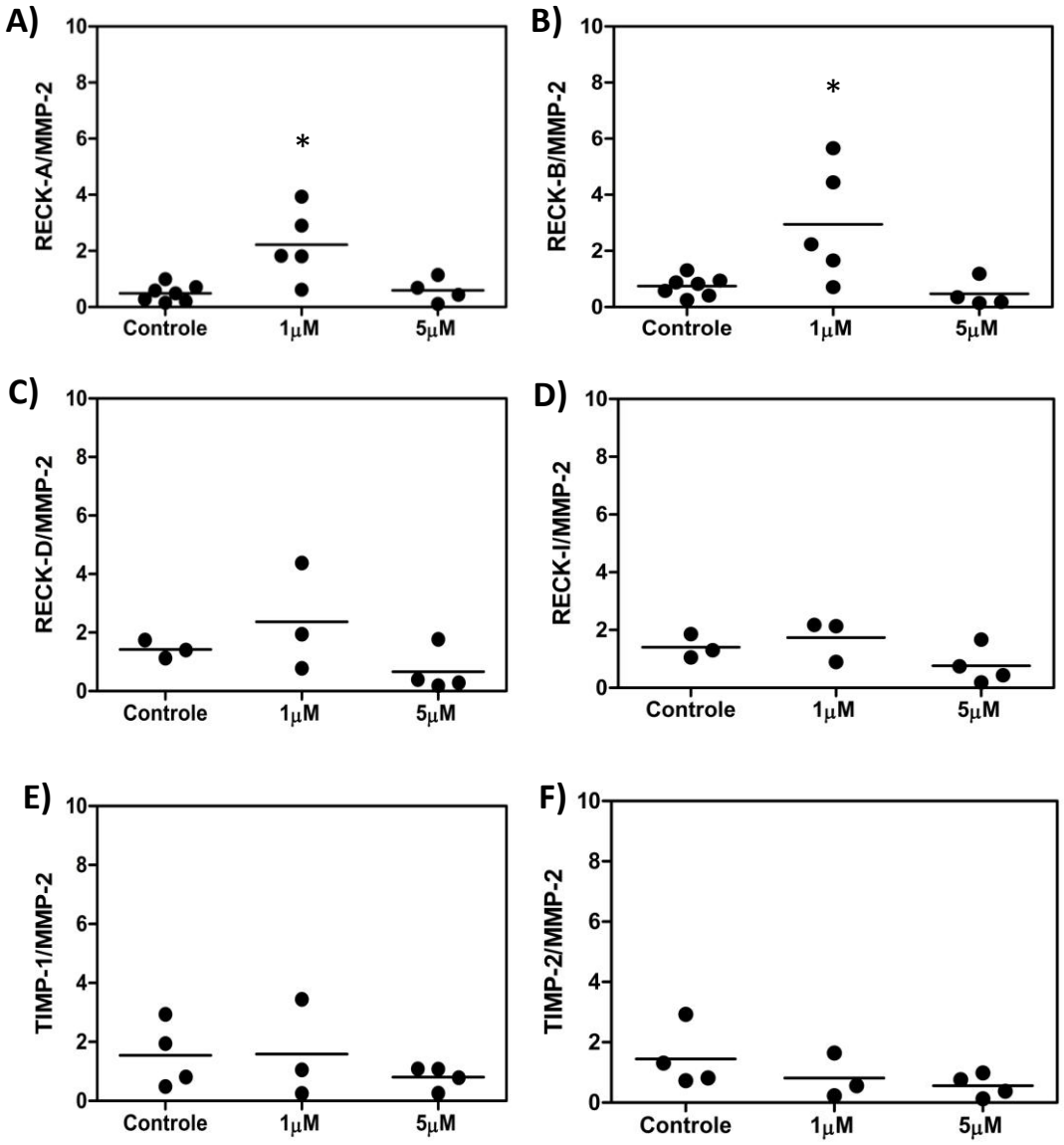


FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/*MMP-2*

NOTA: Gráfico das razões dos inibidores/*MMP-2*. A) RECK-A; B) RECK-B; C) RECK-D; D) RECK-I; E) TIMP-1 e F) TIMP-2. *T-test (Mann-Withney)* A) * = p=0,0101; B) * = p=0,0303.

TABELA 4 – RAZÃO INIBIDOR/*MT1-MMP*

	RECK-A	RECK-B	RECK-D	RECK-I	TIMP-1	TIMP-2
C	0,53 ± 0,04	0,86 ± 0,11	1,14 ± 0,22	1,12 ± 0,19	0,78 ± 0,16	0,77 ± 0,13
1μM	0,62 ± 0,09	0,76 ± 0,13	1,16 ± 0,30	1,06 ± 0,10	1,10 ± 0,16	0,74 ± 0,09
5μM	0,56 ± 0,15	0,22 ± 0,03	0,36 ± 0,05	0,52 ± 0,10	0,93 ± 0,41	1,01 ± 0,44

Resultados indicam média das razões ± SEM de quatro experimentos independentes.

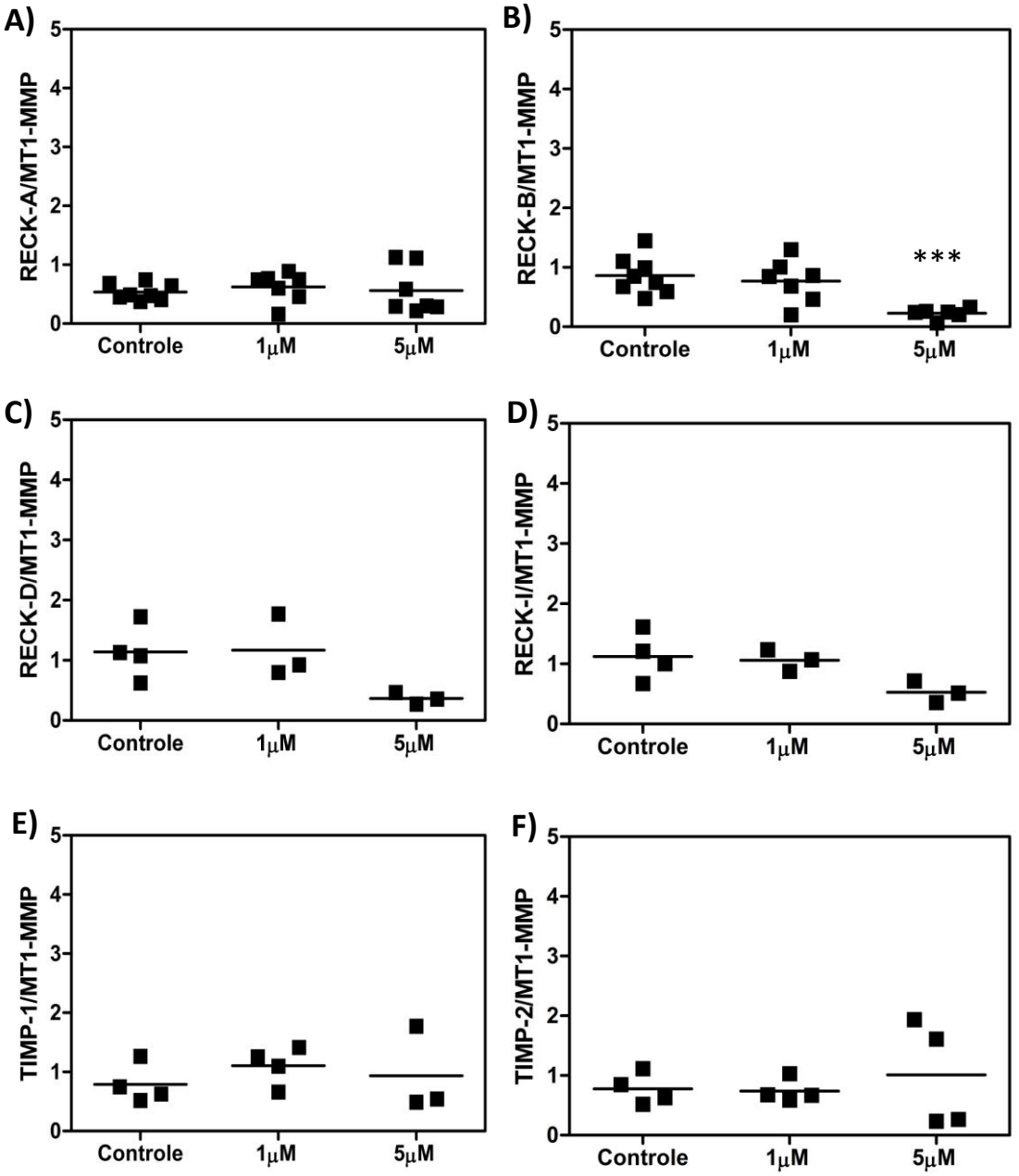


FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/*MT1-MMP*

NOTA: Gráfico das razões dos inibidores/*MT1-MMP*. A) RECK-A; B) RECK-B; C) RECK-D; D) RECK-I; E) TIMP-1 e F) TIMP-2. B) *T-test (Mann-Withney)* ***= p=0,0007.

TABELA 5 – RAZÃO INIBIDOR/*MMP-9*

	RECK-A	RECK-B	RECK-D	RECK-I	TIMP-1	TIMP-2
C	0,61 ± 0,36	1,07 ± 0,73	1,31 ± 0,87	1,26 ± 0,80	0,75 ± 0,36	0,87 ± 0,55
1μM	1,14 ± 0,76	1,35 ± 0,86	1,76 ± 0,90	1,75 ± 1,07	1,97 ± 1,28	1,19 ± 0,65
5μM	0,67 ± 0,31	1,46 ± 0,75	0,82 ± 0,35	1,12 ± 0,53	1,30 ± 0,61	0,63 ± 0,29

Resultados indicam média das razões ± SEM de quatro experimentos independentes.

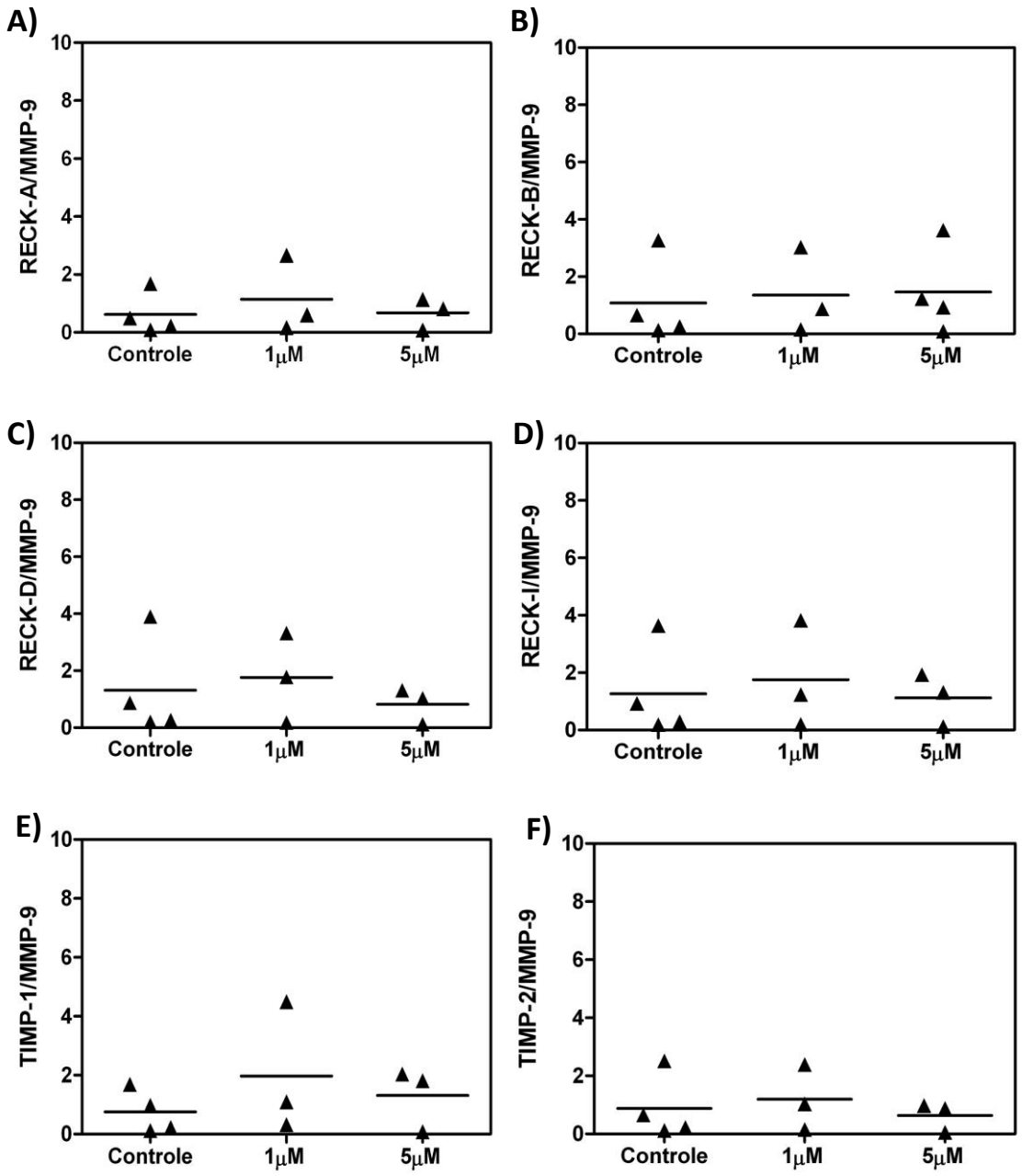


FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES INIBIDORES/*MMP-9*

NOTA: Gráfico das razões dos inibidores/*MMP-9*. A) RECK-A; B) RECK-B; C) RECK-D; D) RECK-I; E) TIMP-1 e F) TIMP-2.

Através da análise dos resultados obtidos pode-se concluir que as razões RECK-A/*MMP-2* e RECK-B/*MMP-2* aumentam quando as células são tratadas com 1µM de sinvastatina, sendo que este aumento é estatisticamente significativo. Na dose de 5µM, entretanto, as razões voltam a se nivelar às dos controles. Não ocorrem alterações significativamente estatísticas nas razões de RECK-D/*MMP-2*, RECK-I/*MMP-2*, TIMP-1/*MMP-2* e TIMP-2/*MMP-2* após o tratamento com sinvastatina (TABELA 3). É interessante notar aqui que os resultados estatísticos da modulação positiva nas razões inibidor/*MMP-2* após o tratamento com sinvastatina (evidenciando uma condição de aumento da expressão relativa do inibidor frente à expressão desta *MMP*) são obtidos apenas com as duas isoformas do gene *RECK* que apresentam ancoramento à membrana por cauda GPI, sugerindo que a inibição de *MMP-2* mediada por este agente anti-tumoral pode ser devido à uma ação (talvez conjunta) destas duas isoformas de *RECK*.

Não são observadas mudanças significativas nas razões RECK-A/*MT1-MMP* após o tratamento com sinvastatina. Para RECK-B ocorre diminuição estatisticamente significativa da razão após tratamento com 5µM de sinvastatina. As razões RECK-D/*MT1-MMP*, RECK-I/*MT1-MMP*, TIMP-1/*MT1-MMP* e TIMP-2/*MT1-MMP* permanecem inalteradas após o tratamento com sinvastatina em células SK-MEL 28 (TABELA 4).

Não é observada alteração significativa nas razões inibidores/*MMP-9* após tratamento das células SK-MEL 28 com sinvastatina para *RECK* canônico, tampouco suas isoformas ou para os inibidores clássicos (FIGURA 21).

7.7 VARIAÇÃO DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK* EM RELAÇÃO AO TRANSCRITO CANÔNICO EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

Pode-se analisar a expressão dos transcritos alternativos de *RECK* em relação ao trancrito canônico após o tratamento com várias doses de sinvastatina. A razão entre a expressão relativa de RECK-B/RECK-A, RECK-D/RECK-A e RECK-I/RECK-A é um bom indicativo da variação das quantidades dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à isoforma canônica. Estas razões podem ser visualizadas na tabela 6, e a

representação gráfica é apresentada na figura 22.

TABELA 6 – RAZÕES RELATIVAS DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS/TRANSCRITO CANÔNICO DE *RECK* EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

	RECK-B/RECK-A	**RECK-D/RECK-A**	**RECK-I/RECK-A**
C	1,60 ± 0,12	1,65 ± 0,27	1,65 ± 0,26
1μM	1,21 ± 0,07	1,31 ± 0,81	1,05 ± 0,49
5μM	0,86 ± 0,17	0,59 ± 0,32	0,67 ± 0,27

Resultados indicam média das razões ± SEM.

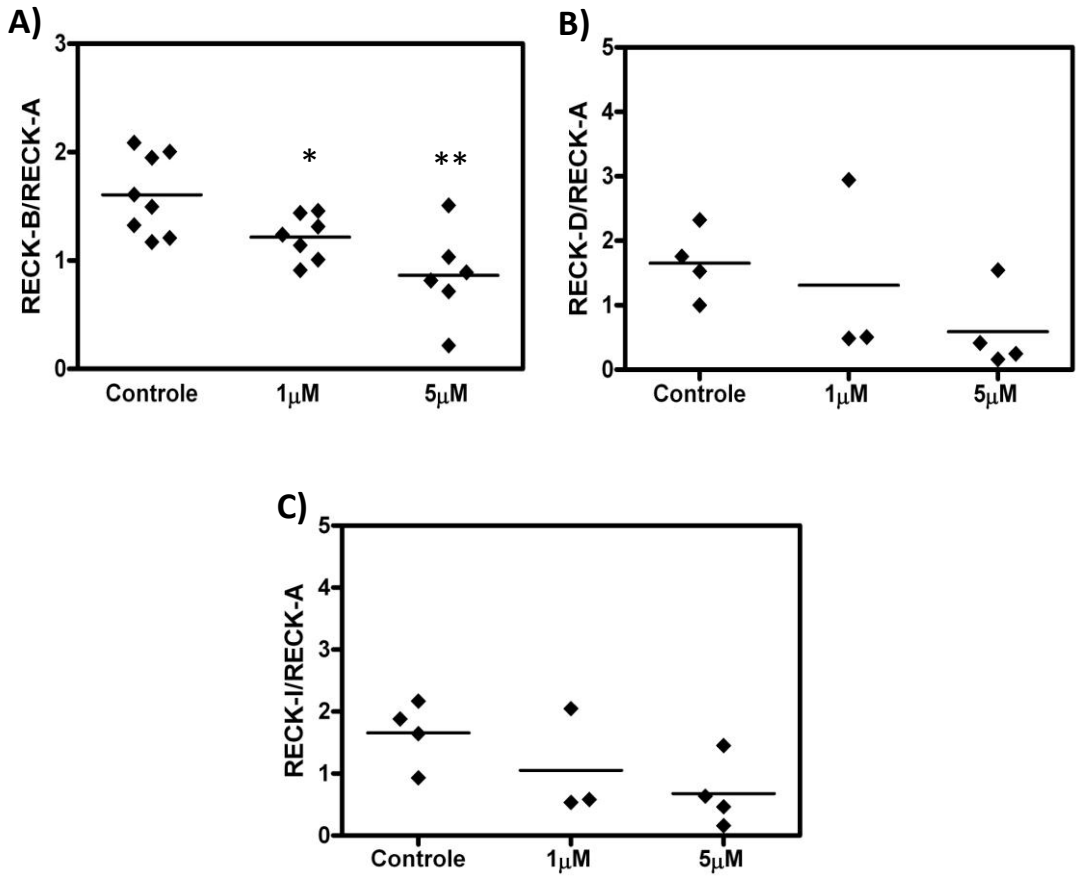


FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS RAZÕES DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS/TRANSCRITO CANÔNICO DE *RECK*

NOTA: Gráfico das razões dos transcritos de *RECK*/RECK-A. A) RECK-B/RECK-A; B) RECK-D/RECK-A; C) RECK-I/RECK-A. A) * = p 0,0401; ** = p=0,0080.

Pode-se observar que os dados de variação dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à RECK-A concordam com os resultados de expressão apresentados anteriormente. A razão RECK-B/RECK-A diminui à medida que a dose de sinvastatina é

aumentada, sendo que obtivemos resultado significativamente estatístico nos tratamentos com 1µM e 5µM de sinvastatina. Como vimos, a redução da expressão de RECK-B faz com que a razão diminua, e que o equilíbrio da quantidade destes transcritos seja deslocado a favor de RECK-A. Por outro lado, apesar da tendência de redução das razões RECK-D/RECK-A e RECK-I/RECK-A, não ocorre significância estatística da diminuição destas após o tratamento com sinvastatina. Convém lembrar que não se observa modulação significativa da expressão de RECK-D e RECK-I em células SK-MEL 28 após o tratamento com 1µM e 5µM de sinvastatina após 72h.

7.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA RECK EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA

Foram discutidos nas seções anteriores dados referentes aos experimentos para análise dos níveis de RNAm de *RECK* presente nas células SK-MEL 28 após o tratamento com sinvastatina. Entretanto, além dos níveis de RNAm, é importante analisar se o tratamento utilizado influi nos níveis de expressão da proteína RECK presentes nas células. Para isto, células SK-MEL 28 foram plaqueadas, tratadas com o agente antitumoral e após 72h foram coletadas, centrifugadas e submetidas à lise em tampão apropriado para extração de proteínas. As proteínas extraídas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose como descrito no item 6.6.2 de Materiais e Métodos. Após incubação com os anticorpos de interesse (anti-RECK e anti-actina), a membrana foi revelada por quimioluminescência e a quantificação dos níveis de proteína RECK presente em cada condição testada foram normalizados pelos níveis detectados de actina (controle interno) através do programa ImageJ.

Não foi observada alteração na quantidade de proteína RECK presente no extrato proteico de células SK-MEL 28 tratadas com 1µM de sinvastatina (FIGURA 24). Não obtivemos resultados satisfatórios para avaliação da quantidade de proteína no extrato protéico de células tratadas com 5µM da droga. Com a diminuição da viabilidade celular após o tratamento com 5µM de sinvastatina (ver FIGURA 12), o rendimento da extração proteica para esta dose foi consideravelmente reduzido, em relação ao rendimento obtido para a condição controle do teste e para a dose de 1µM.

Por este motivo, a quantidade de proteína aplicada para eletroforese SDS-PAGE na dose de 5µM de sinvastatina teve que ser menor do que a quantidade aplicada para o controle e a dose de 1µM, e a marcação com anticorpo anti-RECK não foi evidente (dados não mostrados). Será necessário repetir este experimento com aplicação de uma maior quantidade de proteína para avaliação do nível protéico de RECK no extrato de células tratadas com 5µM de sinvastatina.

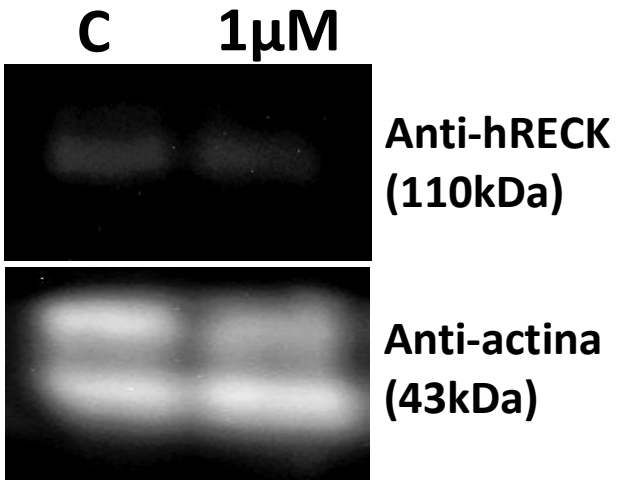


FIGURA 23 – ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA RECK PRESENTE EM CÉLULAS SK-MEL 28 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA
NOTA: Membrana de nitrocelulose hibridizada com anticorpos anti-RECK (1:500) e anti-actina (1:1000) (controle), revelada por quimioluminescência.

Como já mencionado, não se observou alteração na quantidade de proteína detectada na condição controle e no tratamento com 1µM de sinvastatina. É importante frisar, entretanto, que estes dados são referentes ao resultado de um único experimento, e que por isso devem ser analisados com cautela. Além disso, deve ser realizada a repetição deste experimento, inclusive para análise da expressão de proteína RECK após tratamento com 5µM de sinvastatina.

7.9 ATIVIDADE DE MMPs APÓS O TRATAMENTO DAS CÉLULAS SK-MEL 28 COM SINVASTATINA

Para avaliar a atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9, as células foram plaqueadas, o meio de cultura suplementado com soro foi substituído por meio contendo BSA e diferentes doses de sinvastatina, e após 72h, o sobrenadante foi coletado para análise por zimografia gelatinosa (como descrito em Materiais e

Métodos, item 6.6.3). O protocolo foi realizado duas vezes, porém as bandas que evidenciam a degradação da gelatina pelas MMPs não ficaram aparentes, mesmo após a técnica ser realizada com a aplicação de 50µg de proteína total para eletroforese SDS-PAGE (resultados não mostrados).

A ausência de bandas pode resultar de alguma falha na realização da técnica, ou pode refletir uma possível baixa atividade das MMPs na linhagem celular estudada. Estas análises deverão ser repetidas para a efetiva avaliação da atividade destas MMPs em células SK-MEL 28.

8 DISCUSSÃO

O melanoma é um tumor originário dos melanócitos que, quando evolui para a forma metastática, é altamente resistente aos tratamentos disponíveis, e possui prognóstico ruim (MILLER e MIHM, 2006). Vários estudos caracterizaram as alterações moleculares que levam ao desenvolvimento do melanoma, e outros estão sendo realizados a fim de identificar e testar compostos que sejam capazes de atingir os componentes alterados que prejudicam os processos de senescência, controle da proliferação e morte celular dos melanócitos (revisado por PALMIERI *et al*., 2009 e por ROTHER e JONES, 2009). As estatinas são fármacos originalmente utilizados como antilipêmicos, mas que vem despertando interesse por seu efeito antitumoral (CHAN *et al*., 2003). Em linhagens celulares de melanoma humano, a sinvastatina é capaz de induzir parada de proliferação e apoptose, e foi demonstrado que este efeito se dá, entre outros possíveis mecanismos, pela inibição da prenilação de proteínas (Rho e Ras) importantes em várias vias de sinalização celular que podem estar constitutivamente ativas nestas células (SAITO *et al*., 2008).

A interação das células com a matriz extracelular é de extrema importância no processo de metástase, e nesse contexto, ganha importância a ação de proteases (MMPs) que são capazes de clivar componentes da matriz, facilitando o processo de invasão tumoral (revisado por DERYUGINA e QUIGLEY, 2006). Sabe-se que as estatinas são capazes de exercer efeitos na atividade de algumas MMPs, mas estes efeitos foram mais estudados em processos de cicatrização envolvendo células cardíacas e vasculares, e não no contexto de invasão celular (TURNER *et al.*, 2007; TURNER *et al.* 2005; LI *et al.*, 2008). Várias moléculas podem inibir a atividade das MMPs, sendo as TIMPs (inibidores clássicos) os de mecanismo mais bem caracterizado (revisado por NAGASE *et al.,* 2005).

O estudo pioneiro de TAKAHASHI e colaboradores (1998) identificou uma glicoproteína ancorada à membrana (RECK) que também é capaz de inibir as atividades de MMP-2, MMP-9 e de MT1-MMP, e que induziu reversão do fenótipo maligno de fibroblastos transformados pelo oncogene *v-kiRas*. (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.,* 2001). Em uma série de estudos posteriores, foi demonstrado que RECK está associado ao prognóstico de vários tipos de tumores, sendo que, em geral, pacientes que

apresentam tumores que expressam mais RECK possuem melhor prognóstico (revisado por CLARK *et al.*, 2007).

Dessa forma, considerando a ineficácia das abordagens terapêuticas usuais no tratamento do melanoma, sabendo da ação antitumoral da sinvastatina, e de sua ação sobre as MMPs (alvos de RECK), e, além disso, considerando a ausência de informações sobre o papel de RECK em células de melanoma, procuramos investigar os efeitos do tratamento de células de melanoma humano com sinvastatina na expressão de *RECK* e de suas isoformas alternativas de *splicing*. Também procuramos avaliar nesse modelo alterações na expressão de *MMPs* e de seus inibidores clássicos (*TIMPs*). Procuramos relacionar os resultados de expressão com dados de viabilidade celular e com o estudo da progressão do ciclo celular após o tratamento utilizado.

As análises de viabilidade celular demonstraram que o tratamento com sinvastatina é capaz de provocar redução de viabilidade das células SK-MEL 28, e que esta redução é dependente da dose administrada e do tempo de exposição à droga (FIGURA 12). Baixas doses de sinvastatina não são eficazes na diminuição do número de células, tampouco baixo tempo de exposição à droga. As células de melanoma humano demonstraram susceptibilidade ao tratamento somente após 48h de exposição à droga nas concentrações testadas. É importante ressaltar que estes resultados reforçam o papel da sinvastatina como agente antitumoral eficaz e seguro, visto que as doses utilizadas neste estudo são equivalentes às doses administradas na terapia (KNOX, *et al.,* 2001).

Estudos de SAITO e colaboradores (2008) verificaram mudanças morfológicas causadas pela sinvastatina em diferentes linhagens celulares de melanoma. Nossos resultados estão de acordo com este autor, pois observamos o arredondamento e o destacamento das células SK-MEL 28 do suporte plástico após o tratamento com a droga (FIGURA 13). Algumas células permaneceram aderidas através de finos filamentos de citoplasma. Este efeito, segundo o SAITO e colegas (2008), é devido à interferência da sinvastatina na prenilação das proteínas Rho, reguladoras da homeostase do citoesqueleto.

Um dos mecanismos já descritos na literatura da ação antitumoral da sinvastatina é a indução da parada de proliferação celular (SAITO *et al*., 2008). Nossos

resultados da análise da progressão do ciclo celular, obtidos através de citometria de fluxo, corroboram este mecanismo, pois podemos observar o aumento da porcentagem de células SK-MEL 28 em G1, e a diminuição da quantidade de células na fase S-G2, após 72h de exposição a diferentes doses de sinvastatina (FIGURA 15). Também é evidenciado o aumento da porcentagem de células na fase Sub-G1, sendo este aumento da ordem de duas vezes observado com a maior dose de sinvastatina administrada, o que indica o aumento de células com DNA fragmentado após o tratamento.

Estes resultados tomados em conjunto permitem estabelecer uma relação direta entre a toxicidade da sinvastatina com maiores doses e maior tempo de exposição. Esta toxicidade está relacionada com as mudanças morfológicas observadas, bem como com o aumento de células com DNA fragmentado. O efeito antitumoral da sinvastatina é corroborado pelas alterações observadas, e também pelo aumento da quantidade de células de melanoma que param de proliferar após o tratamento.

Os resultados obtidos para as análises de modulação da expressão gênica mediados por sinvastatina são inéditos e promissores. Embora se observe uma tendência à diminuição dos níveis de RNAm do transcrito canônico de *RECK* (RECK-A) após o tratamento com sinvastatina, esta não é estatisticamente significativa (FIGURA 16 – A). A quantificação dos níveis protéicos de RECK nas células SK-MEL 28 após o tratamento com sinvastatina corrobora estes resultados iniciais (FIGURA 24), visto que não ocorrem diferenças significativas dos mesmos, em relação ao nível expresso da proteína RECK na condição controle. Por outro lado, é notável que tenhamos observado diminuição significativa de RECK-B, (FIGURA 16 – B). Estes resultados sugerem que essa isoforma alternativa de *RECK* é regulada de maneira distinta em células de melanoma após o tratamento com sinvastatina.

Com relação aos transcritos alternativos que codificam para as possíveis isoformas solúveis de *RECK* (RECK-D e RECK-I), estes não são modulados significativamente após o tratamento com a droga (FIGURA 16 – C e D).

Os perfis de expressão das metaloproteinases de matriz ficaram semelhantes entre si após o tratamento com sinvastatina. Todas as MMPs avaliadas (*MMP-2, MT1-*

MMP e *MMP-9*) apresentam uma tendência à diminuição dos níveis de RNAm após o tratamento (FIGURA 17).

Em relação aos inibidores clássicos das MMPs (TIMPs), estes também apresentaram um perfil de expressão semelhante entre si após o tratamento com sinvastatina (FIGURA 18). Pode ser observada tendência a diminuição de *TIMP-1*, embora seja evidente somente após tratamento com 5µM de sinvastatina e não significativo. Adicionalmente, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa para *TIMP-2* após o tratamento com 5µM de sinvastatina. É importante lembrar que TIMP-2, juntamente com MT1-MMP, faz parte do complexo de ativação da próMMP-2 presente na membrana plasmática das células (KURSCHAT *et al.,* 1999) e que esta diminuição envolve a redução da quantidade de MMP-2 ativa, o que também pode ser relacionado aos efeitos antitumorais exercidos pela sinvastatina.

É bem estabelecido na literatura que o balanço entre a expressão e a atividade de *MMPs* e seus inibidores é um importante parâmetro para se avaliar o equilíbrio proteolítico ao qual as células estão sendo expostas em uma determinada condição. Com o intuito de avaliar esse balanço foram também realizadas análises referentes às razões entre as expressões relativas dos inibidores e MMPs avaliados neste estudo, antes e após o tratamento com sinvastatina (FIGURAS 19, 20 e 21). De modo geral pode-se constatar que para *MMP-2*, as razões inibidores/*MMP-2* encontram-se equilibradas entre as diferentes condições de tratamento para a maioria dos inibidores avaliados. Somente para RECK-A e RECK-B esta razão é aumentada significativamente após o tratamento com 1µM de sinvastatina (FIGURA 19 – A e B). Para *MT1-MMP*, a razão RECK-B/*MT1-MMP* apresenta diminuição estatisticamente significativa após tratamento com 5µM da droga. Para *MMP-9* não ocorrem alterações das razões inibidores/*MMP-9* após o tratamento, com nenhum dos inibidores avaliados.

Aqui, é interessante notar que apesar da expressão de *RECK*-A não ser significativamente modulada pelo tratamento com sinvastatina (FIGURA 16-A – RNAm – e FIGURA 23 – proteína) vemos que o mesmo possibilitou um deslocamento significativo no balanço entre este transcrito (a forma canônica de *RECK*) e a expressão de *MMP-2*, evidenciando uma condição de aumento da expressão relativa deste inibidor nestas condições. Apesar da isoforma canônica de *RECK* não ser responsável

pela inibição da transcrição de *MMP-2* (os dados descritos até o momento na literatura apontam para a ação de *RECK-A* como um inibidor do processamento proteolítico da pró-MMP2, inibindo a geração da forma MMP-2 ativa), nossos dados permitem a sugestão de que este deslocamento do balanço proteolítico envolvendo *RECK-A* e *MMP-2* deve contribuir para as ações antitumorais exercidas pela sinvastatina.

Em relação à RECK-B, não temos ainda nenhuma descrição sobre sua possível função nas células. Sendo a isoforma RECK-B uma forma truncada da isoforma canônica de *RECK*, que perde a maioria dos domínios funcionais dessa proteína (incluindo os domínios inibidores de serina protease – SPI – e o próprio domínio Kazal), talvez a ação de RECK-B não seja relacionada à inibição direta de MMPs. Porém, é interessante que a razão RECK-B/*MMP-2* esteja aumentada significativamente após o tratamento com 1µM de sinvastatina nas células de melanoma, indicando que apesar da expressão deste trancrito de *RECK* ser inibida significativamente após o tratamento com a droga (FIGURA 19 – B), os níveis de *MMP-2* estão diminuídos ainda mais nessa condição, deslocando o balanço em favor de RECK-B.

É sabido que associações estáveis de esfingolipídeos com o colesterol produzem microdomínios, ligeiramente mais espessos que outras regiões da membrana, e que são enriquecidos com tipos específicos de proteínas de membrana. Estas regiões são conhecidas como *rafts* lipídicos. As proteínas ligadas à GPI comumente estão no folheto externo destes *rafts*. O *raft* e os demais domínios da membrana não estão rigidamente separados, as proteínas de membrana podem se mover para o interior e para fora dos *rafts* lipídicos em segundos. Porém, em uma escala de tempo menor (microssegundos), que é muito relevante para muitos processos bioquímicos sediados na membrana, muitas destas proteínas residem, primariamente, nas regiões de *rafts.* Para processos que envolvem interações entre proteínas de membrana, a sua presença em um *raft* poderia aumentar grandemente a possibilidade de sua colisão (NELSON e COX, 2008).

Como dito anteriormente, não temos nenhuma evidência da ação direta de RECK-B sobre MMPs, porém é interessante notar que esta isoforma alternativa de RECK mantenha ainda predita uma possível ancora GPI que possibilite seu ancoramento à membrana da célula (LIMA *et al.*, 2009), possivelmente em locais

similares aos da isoforma canônica de *RECK*. Estes dados permitem a sugestão de que talvez RECK-B esteja de certa forma competindo com RECK-A pelo mesmo sítio de localização na membrana plasmática e que a ação da sinvastatina em promover a inibição significativa de RECK-B esteja indiretamente promovendo a maior atuação de RECK-A nas células e, desta forma, contribuindo para a modulação negativa de MMPs. Dados adicionais deste trabalho corroboram esta sugestão, visto que a análise da variação da expressão dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à forma canônica (RECK-A) mostra que a razão RECK-B/RECK-A diminui à medida que a dose de sinvastatina é aumentada, sendo que obtivemos resultados estatisticamente significativos nos tratamentos com 1µM e 5µM de sinvastatina. Como vimos, a redução da expressão de RECK-B faz com que a razão diminua, e que o equilíbrio da quantidade destes transcritos seja deslocado em favor de RECK-A. Por outro lado, não ocorre diferença estatística das razões RECK-D/RECK-A e RECK-I/RECK-A (isoformas solúveis de *RECK*) após o tratamento com a droga.

Nossos dados sugerem ainda que RECK-A e RECK-B sejam regulados de maneira distinta nas células de melanoma (pelo menos após o tratamento com sinvastatina) e talvez a maior ou menor atividade de MMPs nas células possa ser devido a uma ação conjunta destas duas isoformas de *RECK*. Estas sugestões concordam com os dados obtidos nesse trabalho que mostram uma tendência evidente de diminuição de expressão de todas as MMPs avaliadas (*MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP*). Nesse sentido, a avaliação da atividade das metaloproteinases de matriz após o tratamento das células SK-MEL 28 com sinvastatina (ensaio de zimografia gelatinosa) será um dado muito importante para a confirmação ou não destas sugestões (ensaios propostos como uma das etapas futuras a serem desenvolvidas).

Um modelo de regulação de RECK-A e RECK-B está proposto na figura 24.

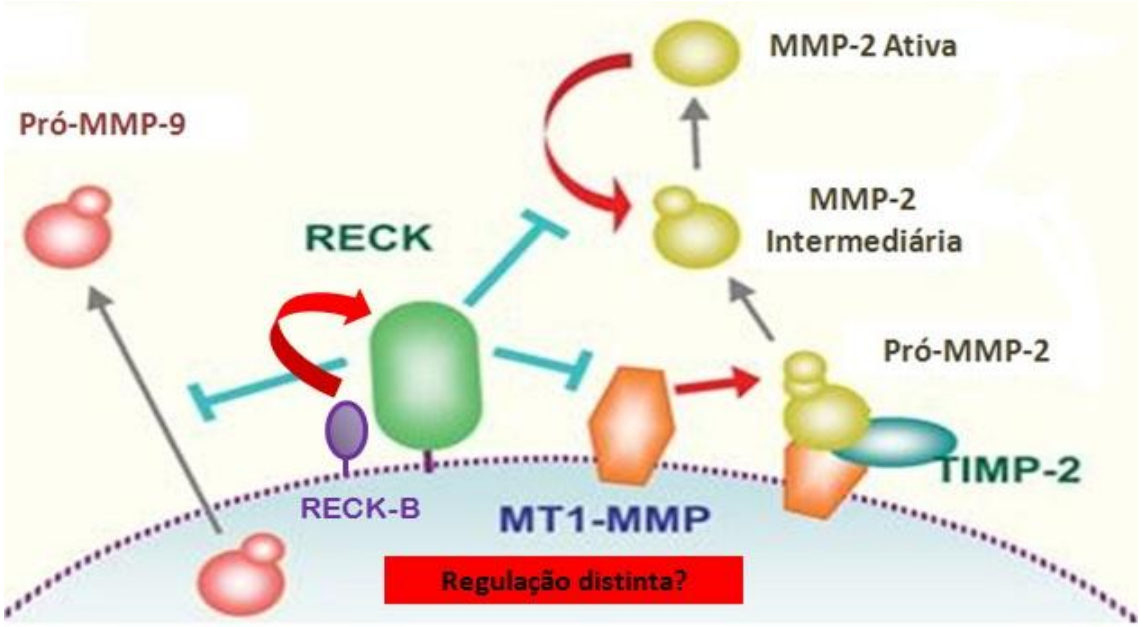


FIGURA 24 – PROPOSTA DE MODELO DE REGULAÇÃO DA ISOFORMA B DE *RECK* EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO TRATADAS COM SINVASTATINA

NOTA: A proteína predita RECK-B, assim como RECK-A, possui um sinal para ancoramento à membrana por cauda GPI. A presença de RECK-B no mesmo microdomínio de RECK-A poderia ser determinante para a ação desta última, visto que as duas proteínas poderiam competir pelo sítio de localização na membrana. A diminuição dos níveis de RECK-B pela sinvastatina poderia ser um fator determinante no aumento da função de RECK-A, o que poderia, em parte, ser relacionado ao efeito antitumoral desta droga em células de melanoma humano.

FONTE: Modificado a partir de NODA e TAKAHASHI (2007).

9 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1) Ocorre redução da viabilidade de células SK-MEL 28 tratadas com sinvastatina de maneira tempo e dose-dependente;
2) As micrografias de contraste de fase demonstram que ocorre mudança morfológica e perda de aderência em células SK-MEL 28 após 72h de tratamento com sinvastatina;
3) Células SK-MEL 28 tratadas com sinvastatina durante 72h sofrem parada de proliferação, e a quantidade de células com DNA fragmentado aumenta. Estas alterações são dependentes de dose;
4) Não ocorre modulação dos níveis do transcrito da isoforma canônica de *RECK* – RECK-A após tratamento com sinvastatina durante 72h;
5) Ocorre diminuição estatisticamente significativa, dependente de dose, dos níves de transcrito da isoforma alternativa de *RECK* denominada RECK-B, em células SK-MEL 28 tratadas com sinvastatina por 72h. Esta regulação negativa pode indicar uma função distinta de RECK-B, em relação à forma canônica de *RECK*, em células de melanoma humano;
6) As demais isoformas de *splicing* do gene *RECK* analisadas (RECK-D e RECK-I) não apresentaram alteração de seus níveis de RNAm após tratamento com sinvastatina por 72h, em células SK-MEL 28; também não foram detectadas alterações nos níveis de mRNA de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP*.
7) Ocorre diminuição estatisticamente significativa dos níveis de *TIMP-2* em células SK-MEL 28 tratadas com 5uM de sinvastatina. O mesmo não foi visto para *TIMP-1*;
8) A variação da expressão dos transcritos alternativos de *RECK* em relação à forma canônica (RECK-A) mostra que a razão RECK-B/RECK-A diminui estatisticamente com o tratamento de sinvastatina em células SK-MEL 28. Este efeito mostrou ser dependente da dose. Por outro lado, não ocorre diferença estatística das razões RECK-D/RECK-A e RECK-I/RECK-A após o tratamento com a droga;
9) As razões RECK-A/*MMP-2* e RECK-B/*MMP-2* aumentam significativamente

quando as células SK-MEL 28 são tratadas com 1µM de sinvastatina, voltando a se equiparar às razões dos controles na dose de 5µM. A razão RECK-B/*MT1-MMP* diminui quando células SK-MEL 28 são tratadas com 5µM de sinvastatina;

10) Os níveis protéicos de RECK não são alterados em células SK-MEL 28 após o tratamento com 1µM de sinvastatina. Estes resultados devem ser confirmados;
11) Os resultados referentes aos testes para atividade de MMPs (zimografia gelatinosa) foram inconclusivos. Estes experimentos devem ser repetidos, para confirmação de atividade de MMPs, e para adequação na execução do protocolo.

10 PERSPECTIVAS

O presente trabalho corrobora os efeitos antitumorais descritos para a sinvastatina, droga que poderia ser utilizada em conjunto com os quimioterápicos convencionais no tratamento do melanoma. Levando em consideração a ausência de dados sobre a modulação de *RECK* e suas isoformas alternativas de *splicing* em células de melanoma, abrem-se novas possibilidades de estudos que possam contribuir para a compreensão da ação desta glicoproteína em modelo de melanoma.

A ação da sinvastatina poderá futuramente ser relacionada com o sítio de localização de RECK na membrana plasmática. Sabemos que proteínas GPI-ancoradas localizam-se em áreas ricas em colesterol (*rafts* lipídicos), e seria interessante estudar se o tratamento com sinvastatina é capaz de modular a localização de RECK na superfície celular. Em 2009, WU *et al.* estabeleceu um protocolo que permite avaliar o conteúdo de colesterol na membrana após exposição à sinvastatina, em modelo de glioma humano.

Outro parâmetro interessante a ser avaliado futuramente seria o efeito da sinvastatina na invasão e migração celular, para que pudéssemos correlacionar as tendências de diminuição da expressão das *MMPs* com uma possível redução na migração e invasão celular. GLYNN e colaboradores (2008) demonstraram redução da migração de células SK-MEL 28 após tratamento com sinvastatina. Seria interessante correlacionar a diminuição da migração com os ensaios de expressão de RECK, isoformas e MMPs (RNAm, proteína e atividade).

Também poderia ser avaliado o papel da sinvastatina na redução de massa tumoral *in vivo*, através de modelo de implante xenográfico. Evidências indicam que a lovastatina não afeta o crescimento do melanoma, porém é capaz de reduzir o potencial metastático das células de melanoma, *in vivo* (COLLISSON *et al.,* 2003) . Estes testes poderiam ser realizados utilizando a sinvastatina, e os resultados poderiam ser relacionados aos dados que obtivemos sobre a expressão de *RECK*, isoformas e *MMPs*.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, B.; HALMOS B.; FEOKTISTOV, A. S.; PROTIVA, P.; RAMEY, W. G.; CHEN, M.; POTHOULAKIS, C.; LAMONT J. T.; HOLT, P. R. Mechanism of lovastatin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 521-528, 2002.

BALL, N. J.; YOHN, J. J.; MORELLI, J. G.; NORRIS, D. A.; GOLITZ, L. E.; HOEFFLER J. P. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. **J Invest Dermatol**, v. 102, p.285-290, 1994.

BARREIRO, E. J.; FRAGA C. A. M. **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos.** Porto Alegre: Artmed, 2008.

BATAILLE, V. Genetics of familial and sporadic melanoma. **Clin Exp Dermatol**, v. 25, p. 464-470, 2000.

BAYNES, J.; DOMINICZAC M. H. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BERNE, R. M; LEVY M. N. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of Surgery,** v. 172, p. 902-908, 1970.

BURKE, J. P.; WATSON, R. W.; MURPHY, M.; DOCHERTY, N. G.; COFFEY, J. C.; O'CONNEL, P. R. Simvastatin impairs smad-3 phosphorylation and modulates transforming growth factor beta1-mediated activation of intestinal fibroblasts. **Br J Surg**, v. 96, p. 541-551, 2009.

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

CHANG, H. C.; CHO C. Y.; HUNG W. C. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. **Cancer Res**, v. 66, p. 8413-8420, 2006.

CHANG, H. C.; LIU L. T.; HUNG W. C. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. **Cell Signal**, v. 16, p. 675-679, 2004.

CHARDIN, P. GTPase regulation: getting aRnd Rock and Rho inhibition. **Curr Biol**, v. 13, p. R702-704. 2003.

CLARK, E. A.; GOLUB, T. R.; LANDER, E. S.; HYNES, R.O. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature**, v. 406, p. 532-535, 2000.

CLARK, J. C.; THOMAS D. M.; CHOONG P. F.; DASS, C.R. RECK - a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, p. 675-683, 2007.

CLARK, W. H.; ELDER, D. E.; GUERRY, D.; EPSTEIN, M. N.; GREENE, M. H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol**, v. 15, p. 1147-1165, 1984.

COHEN, C.; ZAVALA-POMPA, A.; SEQUEIRA, J.; SHOJI, M.; SEXTON, D.; COTSONIS, G.; CERIMELE, F.; GOVINDARAJAN, B.; MACARON, N.; ARBISER, J. Mitogen-actived protein kinase activation is an early event in melanoma progression. **Clin Cancer Res**, v. 8, p. 3728-3733, 2002.

COLEMAN, M. L.; MARSHALL C. J. A family outing: small GTPases cyclin' through G1. **Nat Cell Biol**, v. 3, p. E250-251, 2001.

COLLISSON, E. A.; CARRANZA, D. C.; CHEN I. Y.; KOLODNEY, M. S. Isoprenylation is necessary for the full invasive potential of RhoA overexpression in human melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 119, p. 1172-1176, 2002.

COLLISSON, E. A.; KLEER C.; WU, M.; DE, A.; GAMBHIR, S. S.; MERAJVER, S. D.; KOLODNEY, M. S. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 2, p. 941-948, 2003.

CROWSON, A. N.; MAGRO C.; MILLER, A.; MIHM, M. C. The molecular basis of melanomagenesis and the metastatic phenotype. **Semin Oncol**, v. 34, p. 476-490, 2007.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.; COX, C.; STEPHENS, P. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, p. 949-954, 2002.

DEMIERRE, M. F.; HIGGINS, P. D.; GRUBER, S. B.; HAWK, E.; LIPPMAN, S. M. Statins and cancer prevention. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 930-942, 2005.

DEMIERRE, M. F.; SONDAK, V. K. Cutaneous melanoma: pathogenesis and rationale for chemoprevention. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 53, p. 225-239, 2005.

DENOYELLE, C.; ALBANESE P.; UZAN, G.; HONG, L.; VANNIER, J. P.; SORIA, J.; SORIA, C. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. **Cell Signal**, v. 15, p. 327-338, 2003.

DENOYELLE, C.; VASSE M.; KORNER, M.; MISHAL, Z.; GANNE, F.; VANNIER, J. P., SORIA, J.; SORIA, C. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1139-1148, 2001.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **De Robertis - Bases da Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, p. 9-34, 2006.

DHAWAN, P.; SINGH, A. B.; ELLIS, D. L.; RICHMOND, A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. **Cancer Res**, v. 62, p. 7335-7342, 2002.

EISENBERG, I.; HOCHNER, H.; SADEH, M.; ARGOV, Z.; MITRANI-ROSENBAUM, S. Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. **Cytogenet Genome Res**, v. 97, p. 58-61, 2002.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629-635, 2002.

FECHER, L. A.; CUMMINGS, S. D.; KEEFE, M. J.; ALANI, R. M. Toward a molecular classification of melanoma. **J Clin Oncol**, v. 25, p. 1606-1620, 2007.

FREEMAN, S. R.; DRAKE, A. L.; HEILIG, L. F.; GRABER, M.; MCNEALY, K.; SCHILLING, L. M.; DELLAVALLE, R. P. Statins, fibrates, and melanoma risk: a systematic review and meta-analysis. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, p. 1538-1546, 2006.

FURUMOTO, K.; ARII, S.; MORI, A.; FURUYAMA, H.; GORRIN RIVAS, M. J.; NAKAO, T.; ISOBE, N.; MURATA, T.; TAKAHASHI, C.; NODA, M.; IMAMURA, M. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. **Hepatology**, v. 33, p. 189-195, 2001.

GLYNN, S. A.; O'SULLIVAN, D.; EUSTACE, A. J.; CLYNES, M.; O'DONOVAN, N. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. **BMC Cancer**, v. 8, p. 9, 2008.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851-857, 2007.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J Mol Histol**, v. 35, p. 309-318, 2004.

HATTA, M.; MATSUZAKI, T.; MORIOKA, Y.; YOSHIDA, Y.; NODA, M. Density- and serum-dependent regulation of the Reck tumor suppressor in mouse embryo fibroblasts. **Cell Signal**, v. 21, p. 1885-1893, 2009.

HESS, A. R.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; HENDRIX, M. J. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. **Cancer Res**, v. 63, p. 4757-4762, 2003.

HOFMANN, U. B.; WESTPHAL, J. R.; WAAS, E. T.; ZENDMAN, E. J.; CORNELISSEN, I. M.; RUITER, D. J.; VAN MUIJEN, G. N. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. **Br J Cancer**, v. 81, p. 774-782, 1999.
HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, p. 1216-1219, 2009.

ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; FAUCI, A. S.; CASPER, D. L. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. USA: McGraw-Hill, v. II, 1994.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KIM, N. Y.; LEE J. E.; CHANG, H. J.; LIM, C. S.; NAM, D. H.; MIN, B. H.; PARK, G. H.; OH, J. S. Gamma-irradiation enhances RECK protein levels in Panc-1 pancreatic cancer cells. **Mol Cells**, v. 25, p. 105-111, 2008.

KOOMEN, E. R.; JOOSSE, A.; HERINGS, R. M.; CASPARIE, M. K.; BERGMAN, W.; NIJSTEN, T.; GUCHELAAR, H. J. Is statin use associated with a reduced incidence, a reduced Breslow thickness or delayed metastasis of melanoma of the skin? **Eur J Cancer**, v. 43, p. 2580-258, 2007.

KOYUTURK, M.; ERSOZ, M.; ALTIOK, N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. **Cancer Lett**, v. 250, p. 220-228, 2007.

KOYUTURK, M.; ERSOZ, M.; ALTIOK, N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. **Neurosci Lett**, v. 370, p. 212-217, 2004.

KNOX, J. J.; SIU, L. L.; KAMEL-REID, S.; DIMITROULAKOS, J.; MOORE, M. J.; LUMB, K.; IRISH, J.; LA FRAMBOISE, S.; GULLANE, P.; MCRAE, S.; CHIN, S.; OZA, A. M. A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) and of the cervix. **Proceedings of the 2001 AACR-NCI-EORTC International Conference,** p. 71, 2001.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured in 96-well plates. **Anal Biochem**, v. 182, p. 16-19, 1989.

KURSCHAT, P.; ZIGRINO, P.; NISCHT, R.; BREITKOPF, K.; STEURER, P.; KLEIN, C. E.; KRIEG, T.; MAUCH, C. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix

metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. **J Biol Chem**, v. 274, p. 21056-21062, 1999.

LEE, H. *et al.* TGF-beta signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. **J Cell Biochem**, v. 104, p. 1065-1074, 2008.
LI, M.; LI, Z.; SUN, X. Statins suppress MMP2 secretion via inactivation of RhoA/ROCK pathway in pulmonary vascular smooth muscles cells. **Eur J Pharmacol**, v. 591, p. 219-223, 2008.

LI, W.; CHONG, H.; GUAN, K. L. Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. **J Biol Chem,** v. 276, p. 34728-37, 2001.

LIMA, M.T.; WINNISCHOFER, S. M. B.; CARREIRA, A. C. O.; DEMASI, M.A.A.; COLIN, C.; SOGAYAR, M.C. Isolation and characterization of three novel isoforms of the *RECK* tumor suppressor gene. **Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular,** Águas de Lindóia, 2009.

MAJELLO, B.; DE LUCA P.; LANIA, L. Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. **J Biol Chem**, v. 272, p. 4021-4026, 1997.

MARINI, A.; MIRMOHAMMADSADEGH, A.; NAMBIAR, S.; GUSTRAU, A.; RUZICKA, T.; HENGGE, U. R. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 126, p. 422-431, 2006.

MARSHALL, C. J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. **Curr Opin Genet Dev**, v. 4, p. 82-89, 1994.

MARZOCCO, A.;. GOMES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MASUI, T.; DOI, R.; KOSHIBA, T.; FUJIMOTO, K.; TSUJI, S.; NAKAJIMA, S.; KIOZUMI, M.; TOYODA, E.; TULACHAN, S.; ITO, D.; KAMI, K.; MORI, T.; WADA, M.; NODA, M.; IMAMURA, M. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 1779-1174, 2003.

MENG, N.; LI, Y.; ZHANG, H.; SUN, X. F. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histol Histopathol**, v. 23, p.1003-1010, 2008.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. Genetic risk factors for melanoma. **Hum Genet**, v. 126, p. 499-510, 2009.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, p. 51-65, 2006.

MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Fundamentos de Patologia de Robbins & Cotran - Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica Ilustrada**. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

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

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 274, p. 21491-21494, 1999.

NAJIB, N. M.; IDKAIDEK N.; ADEL, A.; ADMOUR, I.; ASTIRRAGA, R. E.; NUCCI, G. D.; ALAM, S. M.; DHAM, R.; Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two simvastatin 40mg tablets (Simvast e Zocor) in healthy human volunteers. **Biopharm Drug Dispos**, v. 24, p. 183-189, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Principles of Biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

NEWTON BISHOP, J. A. *et al.* Mutation testing in melanoma families: INK4A, CDK4 and INK4D. **Br J Cancer**, v. 80, p. 295-300, 1999.

NODA, M.; OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; KITAYAMA, H.; TAKAHASHI, C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev**, v. 22, p. 167-175, 2003.

NODA, M.; TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. **Cancer Sci**, v. 98, p. 1659-1665, 2007.

OH, J.; SEO, D.; DIAZ, T.; WEI, B.; WARD, Y.; RAY, J.; MORIOKA, Y.; SHI, S.; KITAYAMA, H.; TAKAHASHI, C.; NODA, M.; STETLER-STEVENSON, W. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. **Cancer Res**, v. 64, p.9062-9069, 2004.

OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; MIZOGUCHI, A.; ADACHI, E.; SASAHARA, R.; NISHIMURA, S.; IMAMURA, Y.; KITAYAMA, H.; ALEXANDER, D.; IDE, C.; HORAN, T.; 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, p. 789-800, 2001.

OMHOLT, K.; KROCKEL, D.; RINGBORG, U.; HANSSON, J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. **Melanoma Res**, v. 16, p. 197-200, 2006.

OMURA, A.; MATSUZAKI, T.; MIO, K.; OGURA, T.; YAMAMOTO, M.; FUJITA, A.; OKAWA, K.; KITAYAMA, H.; TAKAHASHI, C.; SATO, C.; NODA, M. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. **J Biol Chem**, v. 284, p. 3461-3469, 2009.

PALMIERI, G.; CAPONE, M.; ASCIERTO, M. L.; GENTILCORE, G.; STRONCEK, D. F.; CASULA, M.; SINI, M. C.; PALLA, M.; MOZZILLO, N.; ASCIERTO, P. A. Main roads to melanoma. **J Transl Med**, v. 7, p. 86, 2009.

PEREIRA, A. M.; STRASBERG-RIEBER, M.; RIEBER, M. Invasion-associated MMP-2 and MMP-9 are up-regulated intracellularly in concert with apoptosis linked to melanoma cell detachment. **Clin Exp Metastasis**, v. 22, p. 285-295, 2005.

PEYSSONNAUX, C.; EYCHENE, A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. **Biol Cell**, v. 93, p. 53-62, 2001.

POLLOCK, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet**, v. 33, p. 19-20, 2003.

PORTER, K. E.; TURNER, N. A.; O'REGAN, D. J.; BALL, S. G. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. **Cardiovasc Res**, v. 64, p. 507-515, 2004.

REDONDO, P.; LLORET, P.; IDOATE, M.; INOGES, S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. **Clin Exp Dermatol**, v. 30, p. 541-545, 2005.

ROTHER, J.; JONES, D. Molecular markers of tumor progression in melanoma. **Curr Genomics**, v. 10, p. 231-239, 2009.

RUSSO, A. E.; TORRISE, E.; BEVELACQUA, Y.; PERROTTA, R.; LIBRA, M.; MCCUBREY, J.; SPANDIDOS, D. A.; STIVALA, F.; MALAPONTE, G. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). **Int J Oncol**, v. 34, p. 1481-1489, 2009.

RUTH, M. C.; XU Y.; MAXWELL, I. H.; AHN, N. G.; NORRIS, D. A.; SHELMANN, Y. C. RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. **J Invest Dermatol**, v. 126, p. 862-868, 2006.

SAITO, A.; SAITO N.; MOL, W.; FURUKAWA, H.; TSUTSUMIDA, A.; OYAMA, A.; SEKIDO, M.; SASAKI, S.; YAMAMOTO, Y. Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells. **Melanoma Res**, v. 18, p. 85-94, 2008.

SASAHARA, R. M.; BROCHADO, S. M.; TAKAHASHI, C.; OH, J.; MARIA-ENGLER, S. S.; GRANJEIRO, J. M.; NODA, M.; SOGAYAR, M. C. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detect Prev**, v. 26, p. 435-443, 2002.

SASAHARA, R. M.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 264, p. 668-675, 1999.

SASAHARA, R. M.; TAKAHASHI, C.; SOGAYAR, M. C.; NODA, M. Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, p. 891-895, 1999.

SCHELLENBERG, M. J. *et al.* Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. **Trends Biochem Sci**, v. 33, p. 243-6, 2008.

SHARPLESS, E.; CHIN, L. The INK4a/ARF locus and melanoma. **Oncogene**, v. 22, p.3092-3098, 2003.

SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. **Nature**, v. 441, p. 424-430, 2006.

SHELLMAN, Y. G.; RIBBLE, D.; MILLER, L.; GENDALL, J.; VANBUSKIRK, K.; KELLY, D.; NORRIS, D. A.; DELLAVALLE, R. P. Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines. **Melanoma Res**, v. 15, p.83-89, 2005.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, p. 1501-1512, 1999.

SIMIZU, S.; TAKAGI, S.; TAMURA, Y.; OSADA, H. RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. **Cancer Res**, v. 65, p.7455-461, 2005.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol Rev**, v. 84, p. 1155-1228, 2004.
SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

STAHL, J. M.; SHARMA, A.; CHEUNG, M.; ZIMMERMAN, M.; CHENG, J. Q.; BOSENBERG, M. W.; KESTER, M.; SANDIRASEGARANE, L.; ROBERTSON, G. P. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Res**, v. 64, p. 7002-7010, 2004.

SYMONS, M.; **Rho GTPases**. EUA: Springer, 2004.

TAKAGI, S.; SIMIZU, S.; OSADA, H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. **Cancer Res,** v. 69, p. 1502-1508, 2009.

TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.; HORAN, T.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.; TAKAI, S.; SASAHARA, R.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B.; ARAKAWA, T.; NODA, M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, p. 13221-13226, 1998.

TAKEDA, I.; MARUYA, S.; SHIRASAKI, T.; MIZUKAMI, H.; TAKAHATA, T.; MYERS, J. N.; KAKEHATA, S.; YAGIHASHI, S.; SHINKAWA, H. Simvastatin inactivates beta1-integrin

and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Cancer Sci**, v. 98, p. 890-899, 2007.

TSUTSUMI, S.; GUPTA, S. K.; HOGAN, V.; COLLARD, J. G.; RAZ, A. Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling. **Cancer Res**, v. 62, p.4484-4490, 2002.

TURNER, N. A.; ALEY, P. K.; HALL, K. T.; WARBURTON, P.; GALLOWAY, S.; MIDGLEY, L.; O'REGAN, D. J.; WOOD, I. C.; BALL, S. G.; PORTER, K. E. Simvastatin inhibits TNFalpha-induced invasion of human cardiac myofibroblasts via both MMP-9-dependent and -independent mechanisms. **J Mol Cell Cardiol**, v. 43, p. 168-176, 2007.

TURNER, N. A.; O'REGAN D. J.; BALL, S. G.; PORTER, K. E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels. **FASEB J**, v. 19, p.804-806, 2005.

VAN DER SPEK, E.; BLOEM A. C.; VAN DE DONK, N. W.; BOGERS, L. H.; VAN DER GRIEND, R.; KRAMER, M. H.; DE WEERDT, O.; WITTEBOL, S.; LOKHORST, H. M. Dose-finding study of high-dose simvastatin combined with standard chemotherapy in patients with relapsed or refractory myeloma or lymphoma. **Haematologica,** v. 91, p. 542-545, 2006.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. 1-12, 2002.

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

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

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

WELSH, C. F.; ROOVERS, K.; VILLANUEVA, J.; LIU, Y.; SCHWARTZ, M. A.; ASSOIAN R. K. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. **Nat Cell Biol**, v. 3, p. 950-957, 2001.

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

WU, H.; JIANG, H.; LU, D.; XIONG, Y.; QU, C.; ZHOU, D.; MAHMOOD, A.; CHOPP, M. Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. **Neurosurgery**, v. 65, p. 1087-1096, 2009.

WU, H.; GOEL, V.; HALUSKA, F. G. PTEN signaling pathways in melanoma. **Oncogene**, v. 22, p. 3113-3122, 2003.

YOSHIDA, D.; NOMURA, R.; TERAMOTO, A. Regulation of cell invasion and signalling pathways in the pituitary adenoma cell line, HP-75, by reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK). **J Neurooncol,** v. 89, p. 141-150, 2008.

12 ANEXOS

Fernanda Augusta de Lima Barbosa

Curriculum Vitae

Bacharel em Biomedicina pela Universidade de Cruz Alta - RS, 2007-II, com habilitação nas áreas de Análises Clínicas e Citopatologia.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2008 – Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Orientação: Prof. Drª. Sheila Maria B. Winnischofer

Co-orientação: Prof. Drª. Glaucia Regina Martinez

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Ensino Superior (CAPES)

2008 – Graduação em Biomedicina, Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ)

Orientação: Prof. Msc. Elisa Sisti

Título: A DETECÇÃO DE CARACTERÍSTICAS HEREDITÁRIAS DA ANEMIA PERNICIOSA ATRAVÉS DE EXAMES CLÍNICOS EM UM GRUPO FAMILIAR

ESTÁGIOS E MONITORIAS

2009	Estágio de Docência em Bioquímica (Aulas Práticas) – UFPR
2007-II	Estágio de Conclusão em Citopatologia, Laboratório Citolab, Não-Me-Toque/RS (512h)
2007-I	Estágio de Extra-Curricular em Análises Clínicas, Laboratório Albuquerque, Carazinho/RS (128h)
2006-I	Estágio Extra-Curricular em Citopatologia, Instituto de Patologia de Passo Fundo/RS (40h)
2005-II	Monitoria em Hematologia Clínica, UNICRUZ, Cruz Alta/RS (60h)
2005-I	Monitoria em Anatomia Humana, UNICRUZ, Cruz Alta/RS (60h)

2005-I Estágio Extra-Curricular em Análises Clínicas, Laboratório Albuquerque, Carazinho/RS (50h)

PROJETOS

2008 – Atual

Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECK E SUAS ISOFORMAS EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

2007

Projeto de Pesquisa: A DETECÇÃO DE CARACTERÍSTICAS HEREDITÁRIAS DA ANEMIA PERNICIOSA ATRAVÉS DE EXAMES CLÍNICOS EM UM GRUPO FAMILIAR

Trabalho de Conclusão Apresentado como Requisito para Graduação em Biomedicina, UNICRUZ

Artigo submetido à Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC), em avaliação.

2006

Projeto de Pesquisa: PERFIL HEMATOLÓGICO DE IDOSOS RESIDENTES NO ASILO SÃO VICENTE DE PAULO, NA CIDADE DE CRUZ ALTA – RS

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Resumos publicados em anais de congressos

Jacomasso, T. ; BARBOSA, F.A.L. ; Lima, M.T. ; Sogayar, M.C. ; Winnischofer, S.M.B. Characterization Of *RECK* Gene Expression And Its Alternative Isoforms In Melanoma Cells. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

BARBOSA, F.A.L. ; Jacomasso, T.; Lima, M.T. ; Sogayar, M.C. ; Martinez, G.R.; Winnischofer, S.M.B. The RECK B Isoform is Downregulated By Simvastatin in Human Melanoma Cells. In: X Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular – SIMEC 2009 & IV Simpósio Internacional de Matriz Extracelular, 2009, Armação dos Búzios.

Apresentação Oral de Trabalho em Simpósio

BARBOSA, F.A.L.; Jacomasso, T.; Lima, M.T.; Sogayar, M.C.; Martinez, G.R.; Winnischofer, S.M.B. The RECK B Isoform is Downregulated By Simvastatin in Human Melanoma Cells. In: X Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular – SIMEC 2009 & IV Simpósio Internacional de Matriz Extracelular, 2009, Armação dos Búzios.

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