



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DIAGNÓSTICO GENÉTICO E MOLECULAR

**Participação da Enolase-2, Metaloproteinases de Matriz -2 e -9 e
Inibidores Teciduais de Metaloproteinases -1 e -2 na Resistência ao
Tratamento com 5-Fluorouracil em Linhagens Celulares de
Câncer Colorretal Humano**

Dissertação para Obtenção do Título de
Mestre em Diagnóstico Genético e
Molecular

Larissa Procópio Corrêa
Orientadora: Prof. Dra. Ivana Grivicich

CANOAS
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

“Dizem que o que todos procuramos é um sentido para a vida.

Não penso que seja assim. Penso que o que estamos procurando é uma experiência de estar vivos, de modo que as nossas experiências de vida, no plano puramente físico, tenham ressonância no interior de nosso ser e da nossa realidade mais íntima, de modo que realmente sintamos o enlevo de estar vivo.”

Joseph Campbell

**“A esperança é um princípio vigoroso
pois leva o cérebro e o coração a
trabalhar e incentiva o homem a dar o
máximo de que é capaz.”**

Collier

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais

Elvira e José Rivadavia

... pela educação, criação, carinho, apoio, compreensão, incentivo, ajuda, amizade e pela vida.

Aos meus Tios

Ana e Chinho

... pela confiança, incentivo e apoio incondicional, sem vocês este objetivo nunca teria sido alcançado.

À minha Orientadora

Prof. Dra. Ivana Grivicich

... pela compreensão, ajuda, cumplicidade, dedicação e pelas palavras de incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Ivana Grivicich, por fazer parte da minha vida acadêmica durante tantos anos, foi minha orientadora como bolsista de iniciação científica, na monografia da especialização e agora na dissertação do mestrado. Agradecer é pouco para tudo o que fizeste por mim, principalmente neste último ano que está sendo um pouco tumultuado. Agradeço pela solicitude a qualquer hora e a qualquer momento, pela compreensão, pela paciência e dedicação. Tenho certeza de que se não tivesse a tua força, conhecimento e interesse, poderia não ter chegado até o final. Agradeço pela tua destreza e indiscutível conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. Daniel Simon, sou extremamente grata pela incrível disponibilidade em escutar, atender e solucionar meus apelos com compreensão e solicitude sempre.

Ao Prof. Dr. Nilo Ikuta, pelo total apoio técnico-científico para a realização dos experimentos e pela disponibilidade do Laboratório de Biologia Molecular.

À Camila Marx, pela disponibilidade, paciência e excepcional apoio técnico na condução dos experimentos.

Aos bolsistas de iniciação científica indispensáveis na realização dos cultivos celulares.

Ao Rafael, pelo amor, amizade, dedicação e ajuda nos momentos mais difíceis.

À Ana Luísa, pela compreensão e paciência.

Ao Centro de Pesquisa em Ciências Médicas da ULBRA.

Enfim, a todos os amigos pelo apoio e incentivo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | 07 |
| LISTA DE TABELAS | 08 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 09 |
| RESUMO | 11 |
| ABSTRACT | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Etiologia e Epidemiologia do Câncer Colorretal | 18 |
| 1.2 Biologia Molecular do Câncer Colorretal | 21 |
| 1.3 Tratamento do Câncer Colorretal | 23 |
| 1.4 5-Fluorouracil (5-FU) | 24 |
| 1.5 Marcadores Tumorais | 28 |
| 1.6 Enolase-2 (ENO2) | 29 |
| 1.7 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)..... | 30 |
| 1.8 Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz (TIMPs)..... | 34 |
| 2. OBJETIVOS | 37 |
| 2.1 Objetivo Geral | 37 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 37 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 3.1 Cultivo e Manutenção das Linhagens Celulares | 38 |
| 3.2 Tratamento com 5-Fluorouracil | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3 Avaliação da Citotoxicidade pelo Método Colorimétrico com Sulforodamina B | 39 |
| 3.4 Extração do RNA das Amostras dos Cultivos Celulares | 39 |
| 3.5 PCR em Tempo Real Quantitativo | 40 |
| 3.6 Determinação do RNAm da ENO2 | 41 |
| 3.7 Determinação do RNAm da MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 | 41 |
| 3.8 Método Comparativo de C_T | 42 |
| 3.9 Análises Estatísticas | 43 |
| 4. RESULTADOS | 44 |
| 4.1 Quimiossensibilidade das Linhagens Celulares de Carcinoma Colorretal Frente ao Tratamento com 5-FU | 44 |
| 4.2 Efeito do 5-FU na expressão da ENO2 nas Linhagens Celulares de Carcinoma Colorretal | 45 |
| 4.3 Efeito do 5-FU na expressão das MMPs-2 e -9 e TIMPs-1 e -2 nas Linhagens Celulares de Carcinoma Colorretal | 45 |
| 5. DISCUSSÃO | 49 |
| 6. CONCLUSÕES | 54 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Evolução Clonal. | 16 |
| Figura 2: Etapas do Processo de Metástase..... | 17 |
| Figura 3: Modelo Genético da Progressão do Câncer Colorretal..... | 21 |
| Figura 4: Classificação de Agentes Antineoplásicos..... | 25 |
| Figura 5: Atividade dos Agentes Quimioterápicos Antineoplásicos..... | 26 |
| Figura 6: Estrutura Química do Uracil, 5-FU e Timina..... | 27 |
| Figura 7: Efeito do tratamento com 5-FU nas linhagens celulares de carcinoma colorretal HT-29 (a) e SNU-C4 (b)..... | 44 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Sistema TNM para Estadiamento Clínico do Câncer Colorretal. | 20 |
| Tabela 2: Classificação das Metaloproteinases de Matriz..... | 33 |
| Tabela 3: Valores de ΔC_T da TIMP-1 e TIMP-2. | 46 |
| Tabela 4: Valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ da TIMP-1 e TIMP-2. | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU – 5-Fluorouracil

APC – Adenomatosis Polyposis Coli

CCS – Ciclo Celular Específico

Cox-2 – Ciclooxigenase-2

DCC – Deleted in Colon Cancer

dTMP – Deoxitimidina Monofosfato

dTTP – Deoxitimidina Trifosfato

dUMP – Deoxiuridina Monofosfato

ENO2 – Enolase-2

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar

FdUMP – Fluorodeoxiuridina Monofosfato

FUTP – Fluorouridina Trifosfato

HNPCC – Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo

HSP70 – Proteína de Choque Térmico 70

LV - Leucovorin

MEC – Matriz Extracelular

MMR – Reparo de Mal Emparelhamento

MMPs – Metaloproteinases de Matriz

MT-MMP – Metaloproteinases de Matriz Tipo Membrana

pTNM – Estadiamento Anatomopatológico

rEGF – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

TIMPs – Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz

TS – Timidilato Sintase

RESUMO

O carcinoma que acomete o cólon e o reto representa o segundo tipo de neoplasia mais prevalente no mundo. A tumorigênese desta neoplasia é um processo complexo que ocorre em múltiplos passos, através de uma série de mutações gênicas. O tratamento padrão para pacientes com estágios avançados de câncer colorretal consiste de cirurgia seguida de quimioterapia adjuvante. O tratamento adjuvante, nestes casos, utiliza esquemas incluindo o 5-fluorouracil (5-FU). Um fator para o êxito da quimioterapia é a precocidade no diagnóstico do tumor, enquanto que o principal fator limitante é a resistência ao agente antineoplásico. Os avanços recentes na genética e na biologia molecular permitiram a identificação de genes e proteínas produzidos ou superexpressos pelos tumores, os chamados marcadores tumorais. Esses marcadores podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando no diagnóstico precoce, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento. Estudos sugerem que a enolase-2 (ENO2) e as metaloproteinases de matriz (MMPs) estão envolvidas na resposta ao tratamento com quimioterápicos. Considerando que a resistência ao tratamento com 5-FU não é totalmente explicada, o objetivo deste estudo é investigar a participação da ENO2, das MMPs -2 e -9 e dos TIMPs -1 e -2 na resposta ao tratamento com 5-FU em linhagens celulares de câncer colorretal humano. Neste sentido, utilizando as linhagens celulares derivadas de câncer colorretal humano HT-29 e SNU-C4 investigamos o efeito citotóxico do 5-FU e associação deste efeito com a expressão da ENO2, das MMPs 2- e -9 e dos TIMPs -1 e -2. Os efeitos antiproliferativos do 5-FU nas linhagens celulares HT-29 e SNU-C4 foram avaliados após 24, 48 e 72 horas através do método colorimétrico SRB e a expressão das MMPs -2 e -9 e TIMPs -1 e -2 após tratamento com IC₅₀ do 5-FU

por 24 h, 48 h e 72 h foram avaliadas por Reação em Cadeia Polimerase em tempo real. A linhagem celular HT-29 demonstrou ser mais resistente ao tratamento com 5-FU (valores de IC_{50} de $8,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$ em 24 h, $7,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$ em 48 h e $18,4 \pm 1,7 \mu\text{M}$ em 72 h) do que a linhagem SNU-C4 (valores de IC_{50} de $2,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$ em 24 h, $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ em 48 h e $7,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ em 72 h). Não encontramos expressão do RNAm da ENO2 e MMPs -2 e -9 nas linhagens celulares por nós estudadas. Por outro lado, o 5-FU demonstrou significativo aumento na expressão do TIMP-1 na linhagem HT-29, enquanto na linhagem celular SNU-C4, foi observado uma redução na expressão do TIMP-1 após tratamento com o 5-FU. A expressão do TIMP-2 aumentou aproximadamente 4 vezes na linhagem HT-29 e duas vezes na linhagem SNU-C4 após tratamento com o 5-FU. Estes resultados sugerem que a expressão do TIMP-1 e TIMP-2 estão associados a resistência ao tratamento com 5-FU nas linhagens celulares estudadas.

Palavras-chave: Carcinoma colorretal, MMPs, ENO2, TIMPs, Marcadores Moleculares, 5-FU.

ABSTRACT

The carcinoma of the colon and rectum, represent the second most prevalent type of neoplasia in the world. The tumorigenesis of this neoplasia is regarded as a complex process that occurs in multiple steps, through a series of genetic mutations. The standard treatment for patients with advanced colorectal cancer consists of surgery followed by adjuvant chemotherapy. Adjuvant treatment in these cases, use schedules including 5-fluorouracil (5-FU). A factor for the success of chemotherapy is the early tumor diagnosis and the principal limiting factor is the resistance to the antineoplastic agent. Recent advances in genetics and molecular biology have enabled the identification of genes and proteins produced or overexpressed by tumors, the so-called tumor markers. These markers can be useful in clinical management of patients with cancer, assisting in the process of diagnosis, staging, therapeutic response assessment, detection of recurrences and prognosis, as well as assisting in the development of new treatment methods. Some evidences suggest that enolase-2 (ENO2) and matrix metalloproteinases (MMPs) play a role in the response to chemotherapy treatment. Considering that the resistance to treatment with 5-FU is not fully explained, the purpose of this study is to investigate the participation of ENO2, MMPs-2 and 9 and TIMPs -1 and -2 in response to treatment with 5-FU in colorectal cancer cell lines. In this sense, using the colorectal cancer cell lines HT-29 and SNU-C4, we have investigated the cytotoxic effects of 5-FU and the association of these effects with the expression of ENO2, MMPs and TIMPs. The antiproliferative effects of 5-FU in cell lines HT-29 and SNU-C4 were evaluated after 24 h, 48 h and 72 h using the colorimetric assay SRB and the ENO2, MMPs and TIMPs expression was assed after the same period of treatment using real time PCR. Comparison of IC₅₀ values showed that the HT-29 cells were relatively resistant to 5-FU (IC₅₀ values of $8.2 \pm 1.3 \mu\text{M}$ at 24 h, $7.7 \pm 1.5 \mu\text{M}$ at 48 h e 18.4

$\pm 1.7 \mu\text{M}$ at 72 h), whereas the SNU-C4 cells presented greater sensitivity to this drug (IC_{50} values of $2.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ at 24 h, $1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ at 48 h e $7.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ at 72 h). We did not observe expression of mRNA of ENO2 and MMPs -2 e -9 in the cell lines. However, 5-FU treatment significantly increased the expression of TIMP-1 in the HT-29 cell line and in the SNU-C4 cells, this treatment led to a decreased of TIMP-1 expression. The expression of TIMP-2 increased approximately 4-fold in the HT-29 cell line and 2-fold in the SNUC-4 cells. Our results suggest that the expressions of TIMPs -1 and -2 are associated with the resistance of 5-FU treatment in the colorectal cancer cell lines studied.

Keywords: carcinoma colorectal, MMPs, ENO2, TIMPs, molecular markers, 5-FU.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte na maioria dos países desenvolvidos, sendo responsável por aproximadamente quatro milhões de óbitos por ano. Cerca de 50% dos pacientes são curáveis com tratamentos loco-regionais disponíveis (Marques, 2003). Nos pacientes que apresentam recidiva da doença ou que inicialmente, são diagnosticados como portadores de enfermidade já disseminada, existem poucas ações disponíveis de tratamento curativo. Desta forma, a descoberta e avaliação de novas estratégias de tratamento e diagnóstico precoce para o câncer representam uma prioridade em saúde pública, justificando o empenho da comunidade científica no estudo da biologia tumoral. Portanto, a compreensão dos mecanismos moleculares que levam ao surgimento e progressão das neoplasias pode contribuir tanto no aprimoramento de estratégias terapêuticas quanto ao prognóstico de cada tipo de câncer (Marques, 2003).

A célula cancerosa é definida por duas propriedades hereditárias, ou seja, ela e sua descendência reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular, e invadem e colonizam regiões normalmente destinadas a outras células. É a combinação dessas duas atividades que faz com que o câncer seja particularmente perigoso. Uma célula anormal isolada que não se prolifere além de suas vizinhanças normais não causa dano significativo (Figura 1). Se, entretanto, sua proliferação estiver fora de controle, ela dará início a um tumor, massa compacta de células anormais continuamente em crescimento (Alberts *et al.*, 2004).

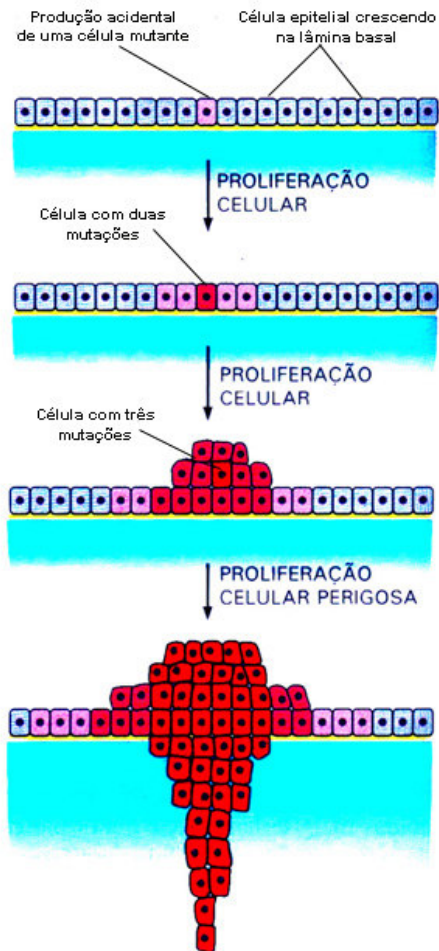


Figura 1: Evolução Clonal. O tumor desenvolve-se a partir repetidas mutações e posterior proliferação, originando um clone de células cancerosas totalmente malignas. Em cada etapa, apenas uma única célula sofre alguma mutação que potencializa a proliferação celular de modo que sua progênie torna-se o clone dominante no tumor. (Adaptado de Alberts *et al.*, 2004).

O tumor é considerado câncer quando for maligno, isto é, somente se suas células já tiverem invadido tecidos adjacentes, geralmente esta invasividade implica na capacidade de desagregação, penetração na corrente sanguínea ou vasos linfáticos e formação de tumores secundários, denominados metástases (Figura 2) (Alberts *et al.*, 2004).

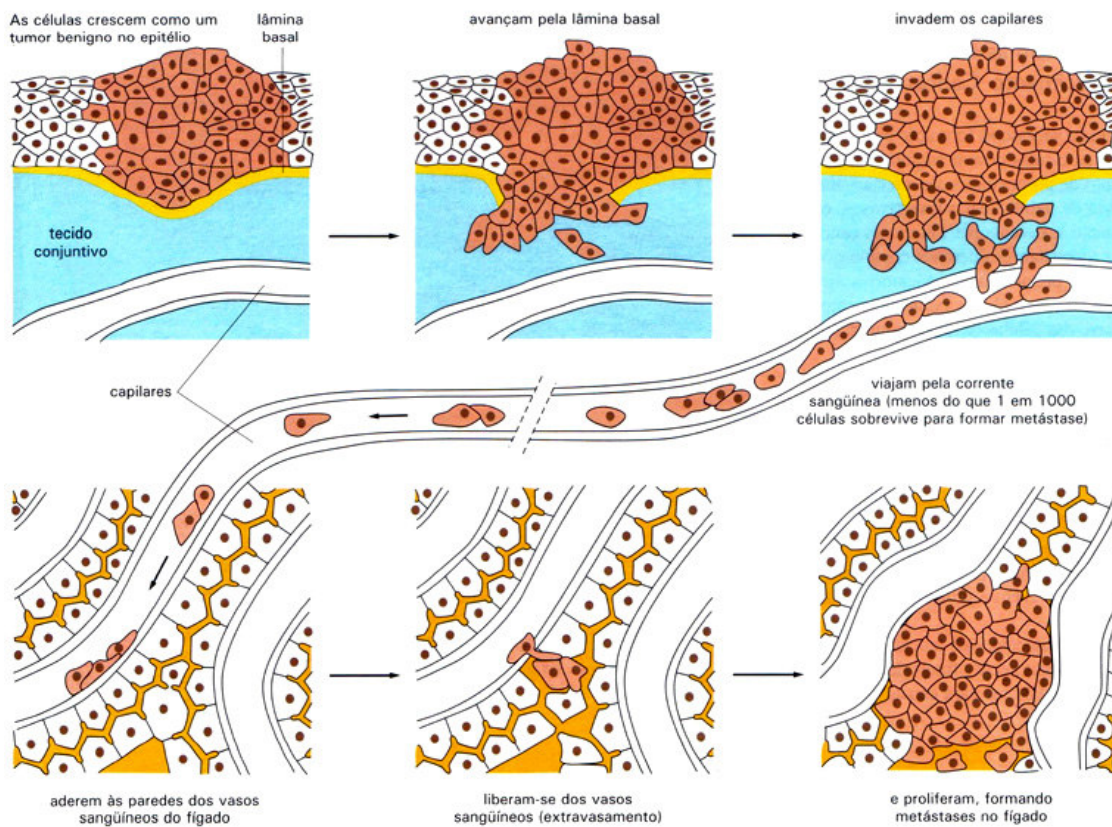


Figura 2: Etapas do processo de metástase. As células tumorais podem entrar na corrente sanguínea diretamente cruzando a parede dos vasos sanguíneos (como representa a figura), ou cruzando as paredes dos vasos linfáticos que, por fim, descarregam seu conteúdo na corrente sanguínea. As células tumorais que entraram em um vaso linfático geralmente ficam presas nos nódulos linfáticos originando a metástase nos linfonodos (Adaptado de Alberts *et al.*, 2004).

Para ter sucesso na formação de um câncer, as células devem adquirir um conjunto de propriedades aberrantes. Diferentes cânceres necessitam de diferentes combinações dessas propriedades, sendo alguns deles: (1) ignorar os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular; (2) ter tendência a evitar a apoptose; (3) contornar limites definidos para a proliferação, escapando da senescência programada evitando a diferenciação; (4) ser geralmente instáveis; (5) escapar do tecido original; (6) e sobreviver e proliferam em novos ambientes (Alberts *et al.*, 2004).

A tumorigênese envolve o descontrole das funções dos proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Tais genes codificam proteínas reguladoras de complexas rotas de transdução de sinais para funções celulares essenciais, tais como: apoptose, diferenciação, adesão, migração e angiogênese. Como consequência, mutações que promovem hiperativação em proto-oncogenes e inativação em genes supressores tumorais contribuem no desenvolvimento de diferentes tumores (Jones e Thompson, 2009).

1.1 Etiologia e Epidemiologia do Câncer Colorretal

No contexto atual, o câncer configura-se um dos principais problemas de saúde pública mundial. É uma doença crônico-degenerativa que afeta várias dimensões da vida humana e causa importante impacto econômico na sociedade, necessitando de tratamento especializado prolongado e oneroso. Além disso, é responsável pela redução do potencial de trabalho humano e perda de muitas vidas (Secoli *et al.*, 2007). Para o ano de 2020, são esperados mais de 15 milhões de casos novos de câncer no mundo (*World Health Organization*; WHO, 2009). Os tumores de maior incidência em ordem decrescente entre homens são pele (exceto melanoma), próstata, pulmão, estômago, cólon e reto. Para as mulheres, pele (exceto melanoma), mama, colo de útero, cólon, reto e pulmão (Secoli *et al.*, 2007; *World Health Organization*; WHO, 2009).

Os tumores malignos que acometem o cólon e o reto representam o segundo tipo de neoplasia mais prevalente no mundo, após o câncer de mama, com uma estimativa de 2,4 milhões de casos nos últimos cinco anos, ou seja, a cada ano estimam-se em 945 mil casos novos (*World Health Organization*; WHO, 2009). Estima-se que para o ano de 2010, o número de novos casos de câncer colorretal no Brasil será de 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres; correspondendo a um risco estimado de 14 novos casos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres. Na região Sul do Brasil, o câncer colorretal é o

terceiro mais frequente em homens e o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres. A sobrevida média para pacientes com câncer colorretal é de 5 anos, não sendo observadas grandes diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer, INCA, 2010). Mais de 80% desses tumores são esporádicos, sendo que os fatores ambientais e dietéticos parecem ser variáveis de grande valor no desenvolvimento desta neoplasia (Kim e Milner, 2007).

O Carcinoma Colorretal pode ser classificado do ponto de vista etiológico em: poliposo adenomatoso familiar (FAP); câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC) e câncer colorretal esporádico. Histologicamente pode ser classificado como: carcinoma, adenocarcinoma e sarcoma (Cohen *et al.*, 1997).

O diagnóstico do cancer colorretal pode ser suspeitado pela história clínica de enterorragia ou sangue oculto nas fezes, dor abdominal, emagrecimento, e confirmado pela endoscopia baixa, seguida de biópsia e anatomopatológico. Os fatores prognósticos do câncer colorretal estão diretamente relacionados ao sistema pTNM de estadiamento (Sobin e Wittekind, 2004), que são estes: grau de infiltração tumoral na parede intestinal (categoria T), a presença ou ausência de envolvimento linfonodal (categoria N) e a presença ou ausência de doença metastática (categoria M), ou seja, ao seu estadiamento clínico (pré-operatório) (Tabela 1), anatomopatológico (pós-operatório) (Cohen *et al.*, 1997) e classificação de Dukes e Astler-Coller (Cotran *et al.*, 2006).

Tabela 1: Sistema TNM para o Estadiamento Clínico do Câncer Colorretal (Adaptado de *American Joint Committee on Cancer, 2002*).

| Tumor Primário (T) | Linfonodos Regionais (N) | Metástases à distância (M) |
|--|---|--|
| (TX) Tumor primário inacessível | (NX) linfonodos regionais inacessíveis | (MX) Presença de metástases à distância não pode ser observada |
| (T0) Sem evidência de tumor primário | (N0) sem evidência de linfonodos regionais | (M0) Sem metástases à distância |
| (Tis) Carcinoma <i>in situ</i> intraepitelial ou invasão da lâmina própria | | |
| (T1) Tumor invadindo submucosa | (N1) Metástase em um até três linfonodos pericólicos ou perirretais | (M1) Metástases à distância |
| (T2) Tumor invadindo a muscular própria | (N2) Metástases em quatro ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais | |
| (T3) Tumor invadindo através da mucosa própria até subserosa ou nos tecidos pericólicos peritonizados ou perirretais | (N3) Metástases em qualquer linfonodo ao longo da cadeia vascular principal e/ou metástase no linfonodo apical desta cadeia | |
| (T4) Tumor invadindo diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfurando vísceras peritoneais | | |

1.2 Biologia Molecular do Câncer Colorretal

A tumorigênese do cólon é considerada como um processo complexo que ocorre em múltiplos passos, através de uma série de mutações gênicas capazes de promover a evolução de uma lesão precursora até um adenocarcinoma invasivo e metastático (Vogelstein *et al.*, 1988). O desenvolvimento e progressão do câncer e a reversão da tumorigenicidade são acompanhados por complexas mudanças no padrão da expressão gênica (Huerta, 2008).

O desenvolvimento do carcinoma de cólon tem sido associado a sucessivas mutações nas células epiteliais de revestimento do intestino, durante vários anos. De acordo com o modelo proposto por Vogelstein *et al.* (1988), um dos primeiros passos na tumorigênese colorretal é a inativação do gene supressor de tumor *APC* (Figura 3). A proteína APC está envolvida nos processos de migração, adesão, proliferação e organização do citoesqueleto (Bos *et al.*, 1987; Fearon and Gruber, 2001). Mutações no APC estão presentes em 60% dos cânceres colorretais esporádicos e em 63% dos adenomas (Rupnarain *et al.*, 2004).

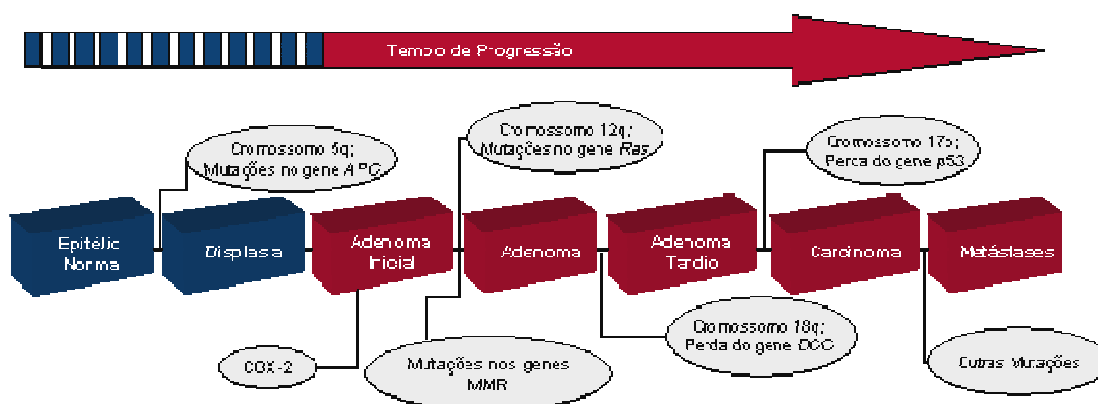


Figura 3: Modelo genético da progressão do câncer de cólon (Cox-2 = ciclooxigenase-2; MMR = reparo de mal-emparelhamento; DCC = *Deleted in Colon Cancer*; APC = *Adenomatous poliposis coli*).

Outras alterações importantes (Figura 3) são mutações na família do gene *ras*, que ocorre em 30% a 50% dos tumores de cólon (Vogelstein *et al.*, 1988). Quando ocorrem, 80% destas mutações são no gene *K-ras* localizado no cromossomo 12 (12p), que codifica a oncoproteína p21ras (Bos *et al.*, 1987). Esta proteína está associada à membrana plasmática, e atua na cascata de transdução de sinais mitogênicos. Os passos seguintes envolvem uma deleção no cromossomo 18 (18q) (Vogelstein *et al.*, 1988), sendo muito freqüente nos carcinomas (70%) e rara em adenomas iniciais (6%). Tal alteração leva à inativação do gene supressor de tumor *DCC* ("deleted in colon cancer"). Este gene está relacionado aos processos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, apresentando papel importante no potencial metastático das neoplasias do cólon (Vogelstein *et al.*, 1988; Bos *et al.*, 1987; Fearon and Gruber, 2001).

As mutações mais tardias (Figura 3) ocorrem no cromossomo 17 (17p) estando relacionada com a transição de adenomas para carcinomas (Vogelstein *et al.*, 1988). A região mutada inclui, entre outros, o gene supressor de tumor *TP53*, que codifica uma fosfoproteína nuclear cuja disfunção contribui para tumorigênese e agressividade do tumor (Bos *et al.*, 1987; Fearon and Gruber, 2001).

Os estudos sobre a biologia do câncer de cólon tem procurado correlacionar o estadiamento e o prognóstico tumoral às alterações genéticas mais freqüentemente descritas na gênese deste tumor (Vogelstein *et al.*, 1988; Fearon e Gruber, 2001). Entretanto, considerando a grande heterogeneidade deste tipo de tumor, sabe-se que muitos outros genes estão envolvidos na iniciação e progressão do tumor. Neste sentido, o uso de marcadores genéticos tumorais pode se tornar um método auxiliar efetivo no estadiamento e no prognóstico tumoral (Mutch, 2007).

1.3 Tratamento do Câncer Colorretal

As taxas de mortalidade do carcinoma colorretal podem ser reduzidas através de estratégias de detecção e tratamento precoces. A possibilidade de prevenção primária, pelo consumo de uma dieta rica em frutas, vegetais e fibras e pobre em gorduras animais também contribui para o controle da mortalidade (Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer; INCA, 2009).

Aproximadamente 70% dos pacientes com câncer de cólon se apresentam com doença aparentemente localizada no momento do diagnóstico. Uma vez confirmada a ausência de envolvimento metastático através de exame clínico, laboratorial e de imagem, estes pacientes são submetidos à ressecção cirúrgica com finalidade curativa (Andre *et al.*, 2004; revisado em Grivicich *et al.*, 2005a). Entretanto, a curabilidade destes pacientes depende da presença ou não de células tumorais ocultas, não detectadas no momento do diagnóstico. Quando estes clones metastáticos persistem no organismo, após a retirada completa do tumor primário, levarão ao desenvolvimento de metástases à distância e à morte do paciente. Uma vez que a presença de metástases ocultas é maior à medida que aumenta o estadiamento do tumor, é de fundamental importância que o tratamento seja planejado de acordo com o estágio da doença (Skibber *et al.*, 2001). Sendo uma neoplasia de difícil diagnóstico inicial, a maioria dos pacientes se apresenta com a doença em fase muito avançada, já com metástases nos linfonodos ou em outros órgãos (Haller, 1998). Nos pacientes com estágios I e II, a cirurgia é curativa em aproximadamente 80% dos casos. Entretanto, nos pacientes com estágio III, a presença de linfonodos regionais está associada a um maior risco de metástases ocultas à distância. Este fato reduz a chance de cura cirúrgica em 50% dos casos (Plate, 2001).

Esta é a base racional para o uso da quimioterapia sistêmica adjuvante após a cirurgia nos pacientes com metástases à distância. A quimioterapia sistêmica adjuvante tem sido capaz de reduzir cerca de 30-40% o risco de

recidiva da doença em estudos prospectivos e randomizados (Sun e Haller, 2005). Ainda que sem a mesma comprovação científica, uma abordagem semelhante tem sido aplicada a pacientes com estágio II, que apresentam fatores prognósticos que sugiram maior risco de recidiva (Cohen *et al.*, 1997).

O tratamento padrão para pacientes com estágio III de câncer do cólon e de casos especiais de estágio II, consiste de cirurgia de ressecção tumoral completa e linfonodos regionais, seguida de quimioterapia adjuvante. O tratamento adjuvante, nestes casos, utiliza esquemas incluindo 5-Fluorouracil (5-FU) e Leucovorin (LV) associados ou não a um terceiro agente. A estimativa de sobrevida em 5 anos para pacientes com câncer de cólon no estágio I é de aproximadamente 85%, enquanto que para pacientes nos estágios II e III é de 70 a 80% e de 25 a 60%, respectivamente (Plate, 2001).

1.4 5- Fluorouracil

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais (Salmon, 1998), particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico (Spence e Johnston, 1996).

Existem vários mecanismos envolvidos na evolução de uma célula normal para uma potencialmente maligna (Hahn e Weinberg, 2002), mas a maior parte deles interfere na divisão celular e assim, o conhecimento do ciclo celular ou dos seus mecanismos é importante para que haja compreensão da etiologia do câncer (Salmon, 1998). Desta forma, a classificação dos fármacos antineoplásicos utiliza como critério principal o ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas de síntese do DNA, transcrição e transdução (Figura 4).

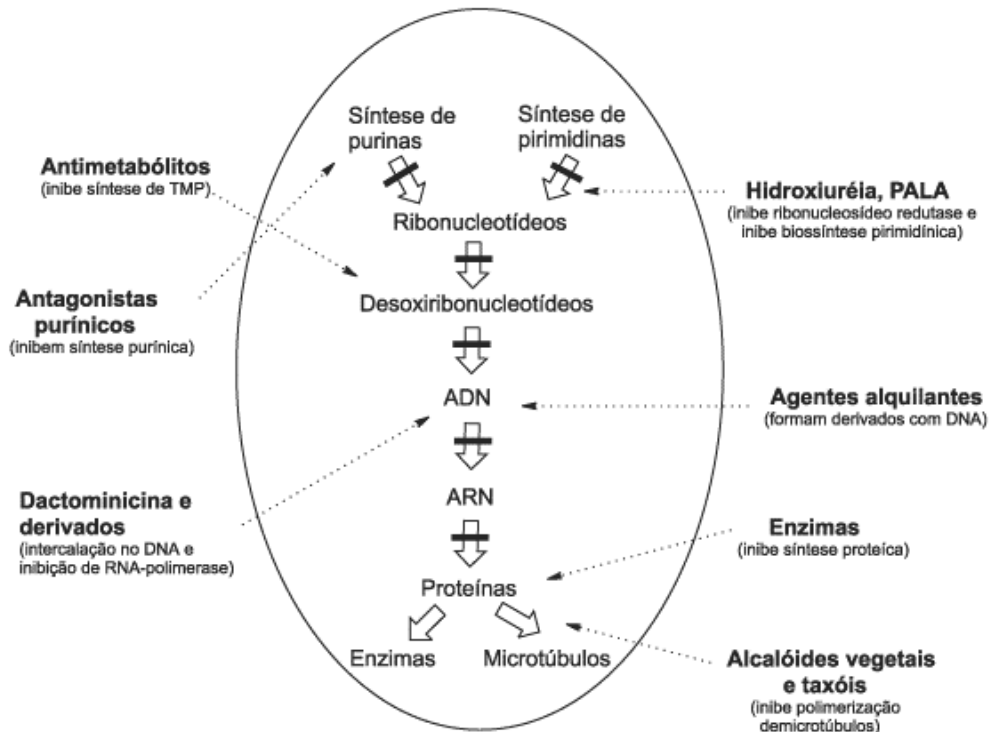


Figura 4: Classificação de agentes antineoplásicos de Calabresi e Chabner (Adaptado de: Almeida *et al.*,2005).

Durante o ciclo celular, a célula que não está se replicando apresenta-se na fase G₀. Nesta fase, o DNA apresenta-se superenovelado, com atividade nuclear baixa. Este estágio pode ser modificado para a fase G₁, onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S (Salmon, 1998). Na fase G₂ há síntese de componentes para a mitose, como a produção do fuso mitótico que é feita na fase M. Após a divisão do material nuclear ocorre a citocinese, finalizando a replicação celular e retornando a fase G₀. A célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna a fase G₀), assim passa da fase M para nova fase G₁ (Almeida *et al.*, 2005) (Figura 5).

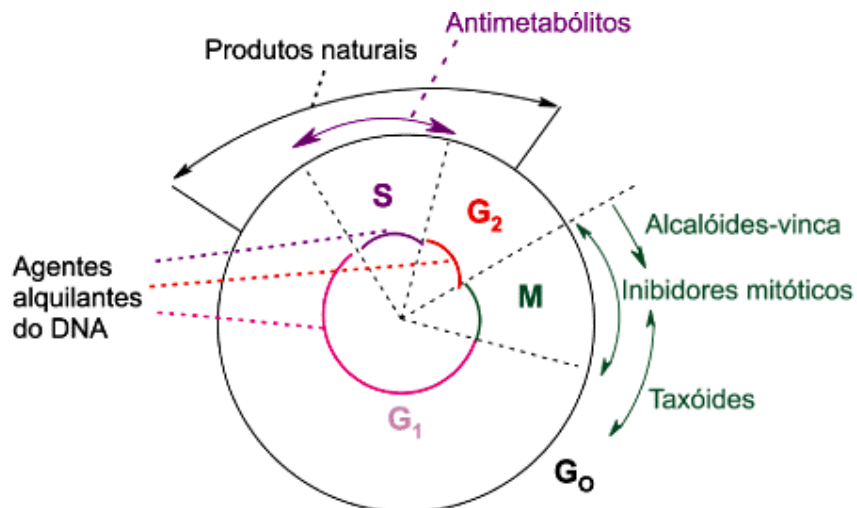


Figura 5: Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular (Adaptado de: Almeida *et al.*, 2005).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular (Figura 5) e são denominados ciclo celular específicos (CCS), com ação sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação. As agentes antimetabólitos (Figura 5) exercem seus efeitos principalmente por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular (Murad e Katz, 2000; Machado, 2000; Oliveira e Alves, 2002). Entre as classes de antimetabólitos utilizados clinicamente no tratamento do câncer, por meio das seguintes subclasses: análogo do ácido fólico, antagonistas das pirimidinas e análogos das purinas. (Almeida *et al.*, 2005)

O 5-FU é um agente antimetabólico que se caracteriza por apresentar semelhanças estruturais com intermediários da síntese de ácidos nucleicos, podendo substituí-los e causar alterações na duplicação celular (Grem *et al.*, 1996). Os agentes antimetabólitos são particularmente ativos em células que se encontram na fase de síntese (fase S) do ciclo celular. O 5-FU é um análogo estrutural do Uracil que apresenta um flúor substituindo o hidrogênio no carbono 6. Devido a esta semelhança na estrutura (Figura 6), o 5-FU utiliza as mesmas rotas metabólicas que o uracil e a timina (Peters *et al.*, 1995).

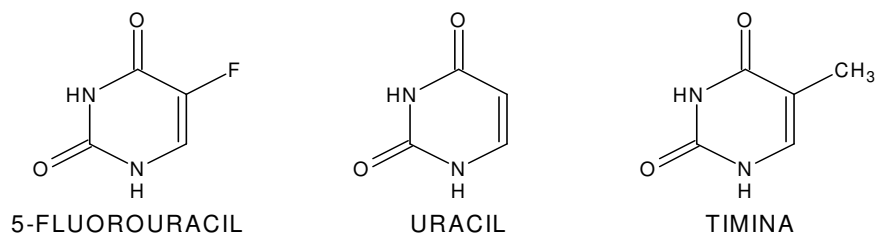


Figura 6: Estruturas químicas do 5-Fluorouracil, Uracil e Timina.

O 5-FU é uma pró-droga que para se tornar ativa necessita ser convertido em fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) pela ação da enzima Timidina Quinase. A utilização clínica do 5-FU ocorre no lugar do FdUMP, porque o 5-FU é solúvel em água enquanto que o FdUMP não possui esta propriedade. O FdUMP, interfere com a síntese do DNA através da inibição da TS (Grem, 1996). A TS transfere o grupo metil do N5, N10 – metileno tetraidrofolato (CH₂-THF) para a deoxiuridina monofosfato (dUMP) formando a deoxitimidina monofosfato (dTMP), que será convertida em deoxitimidina trifosfato (dTTP) um dos quatro deoxirribonucleotídeos essenciais para a síntese do DNA. O FdUMP compete com o dUMP ao ligar-se a TS e ao folato, formando um complexo ternário estável e de lenta dissociação, impedindo a formação do dTTP (Grem, 1996).

O 5-FU também age através da incorporação do falso nucleotídeo fluorouridina trifosfato (FUTP) ao RNA, interferindo com o processamento das várias espécies de RNA (Mandel, 1981; Grem, 1996). Ou ainda, pela incorporação da fluorodeoxiuridina trifosfato (fdUTP) ao DNA, impedindo replicação celular demonstraram que a formação de quebras nas cadeias de DNA, ocorre através da incorporação do FdUTP ácido nucléico, ou devido a ineficiência do reparo causada por defeitos nos resíduos das bases nitrogenadas (Shuetz e Diasio, 1985; Grem, 1996).

O 5-FU é utilizado no tratamento de adenocarcinomas de diversas etiologias como: cólon, reto, estômago, pâncreas, mama e carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (Grem, 1996). Nos carcinomas de cólon este

antimetabólito, quando utilizado sozinho apresenta taxas de regressão tumoral entre 10%-15%, quando administrado junto com o leucovorin (ácido folínico) estas respostas podem chegar a 25%, sem significativa melhora na sobrevida (Secoli *et al.*, 2007).

1.5 Marcadores Tumorais

Os avanços recentes na genética e na biologia molecular permitiram a identificação de genes e proteínas produzidos ou superexpressos pelos tumores. Tais produtos, os chamados marcadores tumorais, antes utilizados apenas como ferramentas de diagnóstico e prognóstico, vêm tomando papel importante no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento, direcionadas a quebrar o ciclo biológico da progressão tumoral (Pacheco *et al.*, 2002). Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. Tais substâncias funcionam como indicadores da presença de câncer, e podem ser produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo, em resposta à presença, extensão, resposta ao tratamento e recorrência da neoplasia. Os marcadores tumorais, em sua maioria, são proteínas ou pedaços de proteínas, incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (Fernandes e Matos, 2002; Almeida *et al.*, 2007). Eles podem ser caracterizados ou quantificados por métodos bioquímicos, imunohistoquímicos ou moleculares (Almeida *et al.*, 2007).

O marcador tumoral ideal reúne características de diagnóstico precoce de neoplasias, estabelecimento da extensão da doença, monitorização da resposta terapêutica e detecção precoce e recidiva (Gomes, 1997; Reis 2005), além de ser órgão-sítio de meia vida curta, permitindo acompanhar temporariamente as mudanças do tumor (Silveira, 2005). Os marcadores tumorais podem ser

utilizados com as seguintes finalidades: triagem populacional, diagnóstico diferencial em pacientes sintomáticos, estadiamento clínico, estabelecimento de diagnóstico, monitorização da eficiência terapêutica, localização de metástases, tratamento (imunorradioterapia) e detecção precoce da recorrência (Almeida, 2004).

Diversos marcadores moleculares já foram associados com a resposta ao tratamento com 5-FU no câncer colorretal. Entre estes, as enzimas timidilato sintase, timidina quinase e diidropirimidina desidrogenase (Peters *et al.*, 1995; Giovannetti *et al.*, 2008); o receptor de fator de crescimento epidérmico rEGF (de Castro-Carpeño *et al.*, 2008); os genes antiapoptóticos *bcl-2* e *bcl-XL* (Violette *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2006); o gene supressor tumoral *TP53* (Boyer *et al.*, 2004); a via de sinalização celular mediada pelo Fas (Moller *et al.*, 1994; Houghton *et al.*, 1997); a proteína de choque térmico Hsp70 (Grivicich *et al.*, 2007); e sistemas de reparo de DNA do tipo excisão de nucleotídeos, mal emparelhamento, recombinação homóloga e reparo pós transcrição (Matuo *et al.*, 2010). Outros estão em investigação, incluindo a enolase-2 (Selga *et al.*, 2008) e as metaloproteinases de matriz (Gallego *et al.*, 2009). Embora, diversos mecanismos foram propostos para explicar a resistência ao 5-FU no câncer colorretal, este processo ainda não é completamente compreendido.

1.6 Enolase-2 (ENO2)

Descrita inicialmente, em 1965, por Moore e McGregor, como enzima catalisadora da via glicolítica anaeróbia, a enolase se encontra distribuída em todos os tecidos dos mamíferos (Moore e Macgregor, 1965). A enolase é uma enzima que participa da via glicolítica, sendo a segunda reação que gera um composto com alto potencial de transferência de grupo fosforil, promovendo a remoção reversível de uma molécula de água do 2-fosfoglicerato, gerando fosfoenolpiruvato (Lehninger *et al.*, 2005). A enolase-2 (ENO2) existe na forma de

diversas isoenzimas diméricas: alfa-alfa, alfa-beta, beta-beta e gama-gama (Marangos *et al.*, 1977).

A presença da ENO2 é mais freqüente, mas não é específica nos tumores cerebrais, já que aumentos na sua concentração foram detectados em carcinomas pulmonares, tumores de células endócrinas e tumores de pâncreas (Lima *et al.*, 2004). Também foi detectada a ENO2 na pineal, hipófise, tiróide, medula adrenal e pâncreas, citando-a como marcador molecular para as células neuroendócrinas centrais e periféricas (Schmechel *et al.*, 1978). Em outro estudo foi verificada a presença de níveis elevados de ENO2 em tumores neuroendócrinos, como glucagonoma, insulinoma, carcinoma de intestino, feocromocitoma, carcinoma medular da tiróide e carcinoma de pulmão de pequenas células (Tapia *et al.*, 1981; Marangos *et al.*, 1982).

Outro aspecto concernente a ENO2 seria sua aplicação como forma de monitor terapêutico nos pacientes em curso quimioterápico, dado que seus valores séricos tendem a subir ou baixar de acordo com a resposta à terapia empregada e até antever recidiva da doença (Bates e Longo, 1987). Selga *et al.* (2008) mostraram relação entre os níveis de ENO2 e resistência ao tratamento com o agente antimetabólito metotrexato na linhagem celular de carcinoma colorretal HT-29. Considerando a classificação do 5-FU como antimetabólito e a ausência de estudos sobre a participação da ENO-2 na resposta ao tratamento com 5-FU, nos avaliamos a existência de associação entre a ENO2 e a resistência ao 5-FU.

1.7 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa de proteínas e polímeros de carboidratos que são secretados pelas células do tecido conjuntivo (Giancotti e Ruoslahti, 1999). Desenvolve papel crucial na manutenção da arquitetura tridimensional tecidual (Kraiem e Koren, 2000), participa de atividades biológicas,

como a proliferação e a diferenciação celular, adesão, migração e a morfogênese de tecidos (Matrisian *et al.*, 1990). A degradação controlada da MEC é uma característica importante em uma variedade de processos biológicos tais como, o desenvolvimento embrionário, remodelação e reparo de tecidos. Por outro lado, a degradação da MEC é também parte essencial dos processos neoplásicos, participando do crescimento, invasão e metástase (Overall e Lopez-Otin, 2002). Para que efetivamente ocorra a invasão tecidual, as células tumorais precisam degradar componentes da matriz extracelular, o que somente é possível pela liberação e ativação de enzimas proteolíticas (Rao *et al.*, 2003). A importância da proteólise na migração celular pode ser demonstrada pelo uso de inibidores de proteases, os quais frequentemente bloqueiam a migração. Além disso, as células que migram facilmente no colágeno tipo I, em cultura, não podem mais migrar se o colágeno torna-se resistente à proteólise por mutações no sítio do colágeno sensíveis a clivagem. A proteólise das proteínas de matriz contribui para a migração celular de várias formas: (1) pode simplesmente abrir o caminho na matriz; (2) pode expor sítios; (3) pode promover o deslocamento da célula para que ela possa se mover ou (4) pode liberar proteínas sinalizadoras extracelulares que estimulam a migração celular (Alberts *et al.*, 2004).

Dentre as enzimas proteolíticas necessárias ao processo de invasão, as metaloproteinases de matriz (MMPs) parecem ser fundamentais (Chintala *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 2001; Heslin *et al.*, 2001). As metaloproteinases de matriz constituem uma família de proteases neutras dependentes de íons metálicos (Cálcio e Zinco), fundamentais na degradação da MEC, um dos principais eventos em diversos processos fisiológicos e patológicos (Woessner, 1991; Pellegrini *et al.*, 2000; Aqueznay *et al.*, 2007).

Entre os 25 membros já identificados, 24 estão presentes no genoma de mamíferos e mais especificamente, 22 em humanos (Sorsa *et al.*, 2006). Apesar de geneticamente distintas, estas endoproteases possuem características bioquímicas e estruturais semelhantes. Entre elas, a presença de pelo menos 2 domínios conservados: o pró-domínio e o domínio catalítico que apresenta o íon Zinco em sua estrutura, necessário para a conversão da forma latente/pró-enzima para a forma ativa/catalítica, mediante interação com resíduos de cisteína do pró-

domínio e sua conseqüente ruptura (Parks *et al.*, 2004). Os níveis constitutivos de expressão gênica de MMPs são normalmente baixos, sendo sua atuação enzimática induzida sob várias circunstâncias fisiológicas como durante a embriogênese, crescimento, reparo tecidual e remodelação (Curran e Murray, 1999; Accorsi-Mendonça *et al.*, 2008).

Geralmente as MMPs tem função de degradar proteoglicanos e matriz glicoprotéica. Este processo de remodelação da matriz extracelular é parte integral do crescimento tecidual normal e diferenciação. Todavia, a desregulação da degradação da matriz extracelular no processo de carcinogênese pode conduzir vantagem para a célula de câncer. Algumas evidências sugerem que proteinases, especificamente as MMPs, estão envolvidas nos estados iniciais da progressão tumoral (Coussens e Werb, 1996). A carcinogênese e o desenvolvimento do câncer colorretal são processos de várias etapas, caracterizadas por mudanças progressivas na quantidade ou atividade de proteínas que regulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Heslin *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003). A membrana basal e matriz extracelular representam duas barreiras físicas à invasão maligna, e sua degradação pelas MMPs tem papel fundamental na progressão tumoral e disseminação das metástases (Ghilardi *et al.*, 2001). Observações recentes sugerem que as MMPs podem ter papel importante na maturação da neovascularização tumoral (Chantrain *et al.*, 2006). Assim fica, evidente que as MMPs participam dos mecanismos fisiológicos de desenvolvimento celulares e patológicos da carcinogênese, pois os tumores primários necessitam crescer para se tornarem invasivos (Deryugina e Quigley, 2006). A maturação dos vasos sanguíneos envolve o recrutamento de células murais, e deposição de matriz extracelular (Chantrain *et al.*, 2006).

Considerando as características estruturais e funcionais, as MMPs foram classificadas (Tabela 2) de acordo com a especificidade de substrato em: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana (MT-MMP) e outras (Freije *et al.*, 1994; Balbin *et al.*, 2001).

Tabela 2: Classificação das Metaloproteinases de Matriz.

| GRUPO | MEMBROS | MMP | SUBSTRATO |
|------------------|--|--|--|
| Colagenases | Colagenase Intersticial – 1 Colagenase Neutrofila – 2 Colagenase – 3 | MMP – 1 MMP – 8 MMP – 13 | Colágeno fibrilar tipo I, II, III Colágeno fibrilar tipo I, II, III Colágeno fibrilar tipo I, II, III |
| Gelatinases | Gelatinase A Gelatinase B | MMP – 2 MMP – 9 | Gelatina, Colágeno tipo IV e V, fibronectina Gelatina, Colágeno tipo IV e V, fibronectina |
| Estromelisinases | Estromelisinase – 1 Estromelisinase – 2 Estromelisinase – 3 | MMP – 3 MMP – 10 MP – 11 | Laminina, colágeno não fibrilar, fibronectina Laminina, colágeno não fibrilar, fibronectina Inibidor de proteinase-1, inibidor da serina protease |
| Matrilisinases | Matroilisinase | MMP – 7 | Laminina, colágeno não fibrilar, fibronectina |
| MT – MMP | MT1 – MMP MT2 – MMP MT3 – MMP MT4 – MMP MT5 – MMP MT6 – MMP | MMP – 14 MMP – 15 MMP – 16 MMP – 17 MMP – 24 MMP – 25 | Pró – MMP2, colágenos, gelatina Pró – MMP2, colágenos, gelatina Pró – MMP2, colágenos, gelatina Pró – MMP2, colágenos, gelatina ? ? |
| Outras | Enamelisinase Metaloeslastase ? | MMP – 20 MMP – 12 MMP – 19 | ? Elastina Agrecana |

MMP = matriz metaloproteinase; MT – MMP = matriz metaloproteinase tipo membrana; ? = nomes e/ou substratos ainda não definidos (Adaptado de Curran e Murray, 2000).

As gelatinases são metaloproteinases de matriz envolvidas na proteólise e rompimento de membranas basais, bem como na degradação de colágeno tipo IV, V, colágenos desnaturados (gelatinas), fibronectina e elastina (Martin e Matrisian, 2007), sendo classificadas como MMP-2 (72-kDa, gelatinase A) (Poulsom *et al.*, 1992) e MMP-9 (92-kDa, gelatinase B) (Zeng *et al.*, 1996).

A atividade das MMPs é regulada pela expressão gênica, pela ativação das pró-MMPs em sua forma ativa e pela inibição da atividade das MMPs pela ação das proteínas inibidoras teciduais de metaloproteinases. A indução da expressão gênica de MMPs é mediada por fatores de crescimento, pelo estresse físico, pela transformação maligna, pelas interações da matriz extracelular e pelas interações celulares (Rao *et al.*, 2003). Particularmente, a atividade das gelatinases (MMP2 e MMP9) parece ter uma boa correlação com a progressão tumoral para estágios mais avançados (Sawaya *et al.*, 1996; Chintala *et al.*, 1999; Forsyth *et al.*, 1999). As gelatinases (MMP2 e MMP9) são responsáveis pela degradação do colágeno IV e outros componentes da matriz extracelular, porém também exercem funções na liberação de fatores de crescimento e na ativação de vias de transdução de sinais indutoras da motilidade celular (Heslin *et al.*, 2001; Wick *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2003). Além disso, um recente estudo sugere que o 5-FU pode estar associado com a inibição da invasão e metástase (Abdel-Hamid e Morsy, 2010).

1.8 Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz (TIMPs)

Os níveis de expressão dos genes das MMPs são relativamente baixos em condições normais. No entanto, a expressão é aumentada por determinadas condições fisiológicas, tais como o remodelamento da MEC durante a embriogênese, a reparação de tecidos e remodelamento ósseo. A expressão aumentada das MMPs é igualmente observada em muitas doenças, particularmente nas artrites e em neoplasias. Por outro lado, membros individuais da família das MMPs são estritamente regulados e a expressão é específica para

o tipo de tecido. A regulação das MMPs pode ocorrer por três vias: regulação da transcrição dos genes das MMPs; ativação de proenzimas e atuação dos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz (TIMPs) (Yong *et al.*, 1998).

Os TIMPs são um grupo de 4 reguladores funcionais endógenos com reconhecido potencial de inibição da atividade de MMPs, os TIMP-1, -2, -3 e -4 (Gomez *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2002). Eles são os principais inibidores fisiológicos das MMPs. Os TIMPs são pequenas proteínas, com peso molecular de 20-30 KDa, secretadas que se une as MMPs individualmente, e regulam a atividade de cada MMP (Juca *et al.*, 2008). Estes inibidores possuem apenas dois domínios, o domínio amino terminal de aproximadamente 125 aminoácidos e um domínio com menos de 65 resíduos. O domínio do amino terminal, dos TIMPs é o responsável pela atividade de inibição das MMPs (Murphy e Knauper, 1998).

O balanço entre a atividade destes inibidores naturais e de MMPs determina o grau de degradação da ECM. No entanto, uma variedade de mediadores bioquímicos influencia nesse equilíbrio: fatores de crescimento, hormônios, produtos oncogênicos e os níveis de citocinas pró – e antiinflamatórias (Uchida *et al.*, 2000). As MMPs e TIMPs tem uma participação significativa na facilitação da invasão tumoral e metástases (Brinckerhoff e Matrisian., 2002; Curran e Murray, 2000; Baker *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002; Yana e Seiki *et al.*, 2002), não apenas na degradação direta da MEC, mas também na interação com outros sistemas biológicos implicados na invasão tumoral, incluindo moléculas de adesão, proteínas citoesqueléticas e fatores de crescimento (McCawley e Matrisian, 2000; Egeblad e Werb, 2002; Leeman *et al.*, 2003). Também protegem as proteínas de superfície celular necessárias para a migração e a adesão celular. A superexpressão das TIMPs inibe a migração de alguns tipos celulares, indicando a importância das metaloproteinases na migração (Alberts *et al.*, 2004). Os TIMPs inibem a atividade das MMPs pela formação de um complexo com o sítio catalítico dessas enzimas. A inibição ocorre de maneira específica, sendo que o TIMP-1 bloqueia a proenzima de MMP-9 e TIMP-2 a MMP-2 (Butler *et al.*, 1998).

Pesquisas em câncer sugerem que as MMPs e os TIMPs estão envolvidos na progressão da doença. Assim, estas enzimas podem ser utilizadas como marcadores em programas de prevenção e monitoramento clínico. As MMPs tem grande importância na fisiologia e patologia dos processos de cicatrização, adesão, angiogenese, invasão tumoral e metástase (Pellegrini *et al.*, 2000; Agueznay *et al.*, 2007). Já, o aumento dos TIMPs apresentam associação com a progressão tumoral (Lu *et al.*, 1991) e também com diminuição da resposta ao tratamento quimioterápico no câncer colorretal (Aldulaymi *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando que a resistência ao tratamento com 5-FU não é totalmente explicada, o objetivo deste estudo é investigar a participação da ENO2, das MMPs -2 e -9 e dos TIMPs -1 e -2 na resposta ao tratamento com 5-FU em linhagens celulares de câncer colorretal humano.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar o efeito citotóxico do 5-FU nas linhagens celulares derivadas de câncer colorretal humano HT-29 e SNU-C4.

Verificar se a expressão da ENO2, MMPs -2 e -9 e dos TIMPs -1 e -2 estão associados com as respostas ao tratamento com 5-FU nas linhagens celulares derivadas de câncer colorretal humano HT-29 e SNU-C4.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo e Manutenção das Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares derivadas de carcinoma de cólon humano HT-29 obtida da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EUA) e SNU-C4 gentilmente cedida pelo Dr. G. J. Peters (Free University Hospital, Amsterdam, Holanda). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² com meio de cultura RPMI-1640, contendo 10% de FCS, a uma temperatura de 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de 95%. As culturas foram mantidas em crescimento exponencial através do subcultivo das células a cada dois dias.

3.2 Tratamento com 5-Fluorouracil

As linhagens celulares HT-29 e SNU-C4 foram tratadas durante 24 h, 48 h e 72 h com diluições seriadas (0 – 50 µM) de 5-FU para determinar a dose que inibe o crescimento celular em 50% (IC₅₀). Os controles negativos foram cultivados durante os mesmos períodos de tempo em meio de cultura sem adição do 5-FU. As doses de IC₅₀ foram utilizadas nos experimentos seguintes.

3.3 Avaliação da Citotoxicidade pelo Método Colorimétrico com Sulforodamina B

As linhagens celulares foram inoculadas em placas de 96 *wells* e, estabilizadas por 24 h e então, tratadas com o 5-FU em diferentes tempos de exposição. Após esse período, as células foram fixadas em ácido tricloroacético (TCA; 50%) e coradas com Sulfurodamina B (SRB; 0,4%). O SRB que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas celulares. O excesso de SRB foi removido com ácido acético (1%). O SRB ligado às proteínas foi solubilizado com base Trizma 10 mM pH 10.5 (Skehan *et al.*, 1990).

O SRB ligado é proporcional a densidade celular e foi determinado através das absorbâncias medidas em um comprimento de onda de 540 nm usando um leitor de microplacas. Os resultados foram corrigidos pelas absorbâncias dos *background*. O perfil de dose-resposta foi plotado, e deste, derivado os valores de IC₅₀, isto é, a concentração de droga necessária para inibir 50% do crescimento celular, quando comparada aos controles sem droga.

3.4 Extração do RNA das Amostras dos Cultivos Celulares

RNA foi extraído a partir $2,5 \times 10^5$ células das linhagens HT-29 e SNU-C4 tratadas com IC₅₀ do 5-FU durante 24 h, 48 h e 72 h e células não tratadas, de acordo com o protocolo descrito por Boom *et al.* (1990). O método é baseado nas propriedades de lise e inativação de nucleases pelo tiocianato de guanidina (GuSCN) que em altas concentrações possui a propriedade de adsorver ácidos nucléicos em partículas de sílica. Os ácidos nucléicos retidos nas partículas de sílica foram rapidamente sedimentados por centrifugação, lavados e posteriormente eluídos em solução tampão de baixa salinidade. Resumidamente, as células foram lisados em tampão contendo tiocinato de guanidina. Após a lise, ácidos nucléicos foram ligados a partículas de sílica e subsequentemente lavados

com diversos solventes (solução de lavagem contendo tiocianato de guanidina, etanol 70% e acetona) em etapas consecutivas. Após a secagem, os ácidos nucléicos foram liberados das partículas de sílicas em 50 µL de tampão de eluidor.

3.5 PCR em Tempo Real Quantitativo

A quantificação dos níveis de RNAm foi realizada através da metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Aspectos teóricos e práticos da PCR em tempo real quantitativo foram descritos por Heid *et al.* (1996). O procedimento da PCR em tempo real utiliza um termociclador combinado a um fluorímetro com a capacidade de monitorar opticamente o progresso da amplificação a cada ciclo de PCR (detecção direta do produto de amplificação - amplicon). Assim, quanto maior a concentração de DNA alvo, em ciclos mais precoces ele será detectado, permitindo assim uma inferência quantitativa (Livak *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 1996; Lunge *et al.*, 2002). A amplificação e detecção dos RNAs foram realizadas através da técnica de *Taqman* PCR (Holland *et al.*, 1991). Durante a PCR, a atividade nucleásica 5'-3' da rTth DNA polimerase cliva a sonda fluorogênica TaqMan. A sonda TaqMan consiste de um oligonucleotídeo marcado com um corante fluorescente denominado *reporter* na posição 5' e outro corante, *quencher*, na posição 3'. Durante a reação, o *reporter* e o *quencher* se separam resultando em um aumento da fluorescência do *reporter*. O acúmulo dos produtos da PCR é detectado diretamente pelo monitoramento do aumento da fluorescência do *reporter*. A PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento ABI Prism Applied Biosystems 7000 Sequence Detector System.

3.6 Determinação do RNAm da ENO2

A concentração de mRNA do gene enolase-2 (ENO2, Genebank X51956) foi determinada através da técnica PCR em tempo real quantitativo, tendo-se como alvo o gene que codifica a enolase-2. Foram utilizados os primers ENO2-560F (5'-GTGTGTCTCTGGCCGTGTG-3'), ENO2-697R (5'-CATGAGAGCCACCATTGATCA-3') e a sonda ENO2-650T [5'-(FAM)TCATCCTGCCTGTGCCGGCCT (MGB)-3']. A quantificação de β -globina, gene constitutivo, foi realizada através da utilização dos primers β -globina-354F (5'GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A3') e 455R (5'CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG 3'), e a sonda β -globina-402T[5'-(FAM)AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG (TAMRA)-3', conforme descrito por Lo *et al.*, 2000.

3.7 Determinação do RNAm da MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2

A reação de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram realizadas em uma única reação com os reagentes do kit "TaqMan® Ez RT-PCR Core Reagents" da Applied Biosystems. Resumidamente, as reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L. Cada reação continha tampão 1X TaqMan® EZ (50 mM bicina, 115 mM de acetato de potássio, 0,01 mM de EDTA, referência passiva 1 -ROX-, 8% de glicerol, pH+ 8,2), 300 μ M dATP, 300 μ M dCTP, 300 μ M dGTP, 600 μ M dUTP, 5 mM de acetato de manganês, 2,5 U de rTth DNA polimerase, 1X *Pre-Developed TaqMan Assay Reagents* (primers e sondas do controle endógeno, β -actina), 1X *Assay-on-Demand Gene Expression Assay Mix* (primers e sondas do gene de interesse). Todas as reações foram realizadas em um espectrofotômetro automático (ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 30 min a 60 °C, para a reação de transcrição reversa, 5

minutos a 95 °C, para término da transcrição reversa, e finalmente 40 ciclos, cada ciclo consistindo de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C.

Os iniciadores (*primers*) e as sondas específicas para os genes de interesse foram desenhados e sintetizados pelo serviço Assay-on-Demand™ da Applied Biosystem. A sonda do gene da β -actina humana foi marcada na extremidade 5' com a fluorescência VIC (*reporter*) e na extremidade 3' com TAMRA (*quencher*). As sondas dos genes em estudo (MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2) foram marcadas com FAM (*reporter*) e MGB (*quencher*). A marcação com sondas distintas permite a realização das reações simultaneamente em um mesmo tubo, metodologia conhecida como PCR-*multiplex*. As seqüências dos *primers* e sondas são propriedade da Applied Biosystems.

3.8 Método Comparativo de C_T

Durante cada ciclo da PCR a sonda fluorogênica foi digerida pela atividade endonucleásica da polimerase, gerando um sinal fluorescente. A quantidade de fluorescência foi proporcional a quantidade de cDNA amplificado. O espectrofotômetro automático mede ciclo a ciclo as mudanças na fluorescência de cada amostra e gera um perfil cinético da amplificação do DNA ao longo dos ciclos da PCR. O número do ciclo (chamado de ciclo limiar ou C_T ,'), qual a amplificação inicia a fase exponencial é determinado e este número foi utilizado para a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica de cada RNA de interesse.

A quantificação da transcrição gênica foi realizada através do método de quantificação relativa pela comparação de C_T (ciclo limiar) (Livak e Schmittgen, 2001). Este método foi escolhido pela sua rapidez e facilidade de realização e análise. Nesta quantificação os valores expressos são relativos a uma amostra de referência, chamada de calibrador. Neste trabalho foi utilizado como calibrador a linhagem celular derivada de glioma humano U87-MG (*American Type Culture*

Collection). Inicialmente, os C_T s dos amplicons do gene de interesse e do controle endógeno foram determinados para cada amostra. Diferenças nos C_T s do gene de interesse e do controle endógeno, chamado ΔC_T , foram calculadas para normalizar diferenças na extração de RNA e na eficiência da transcrição reversa (RT). O ΔC_T de cada amostra foi subtraído do ΔC_T do calibrador. Esta diferença é chamada $\Delta\Delta C_T$. Finalmente a quantidade de alvo, normalizada pelo controle endógeno e relativa ao calibrador, foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Desta forma, os valores de todas as amostras são expressos como uma diferença de n-vezes relativa ao calibrador.

3.9 Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada, de acordo com a situação apresentada, através do teste t de Student, análise de variância seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram considerados significativos os resultados nos quais $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Quimiossensibilidade das Linhagens Celulares de Carcinoma Colorretal Frente ao Tratamento com 5-FU

Os efeitos antiproliferativos do 5-FU nas linhagens celulares HT-29 e SNU-C4 foram avaliados após 24, 48 e 72 horas de exposição ao agente antineoplásico. A inibição de crescimento foi observada em 24 h e persistiu até 72 h de tratamento com o 5-FU em ambas as linhagens estudadas (Figura 7).

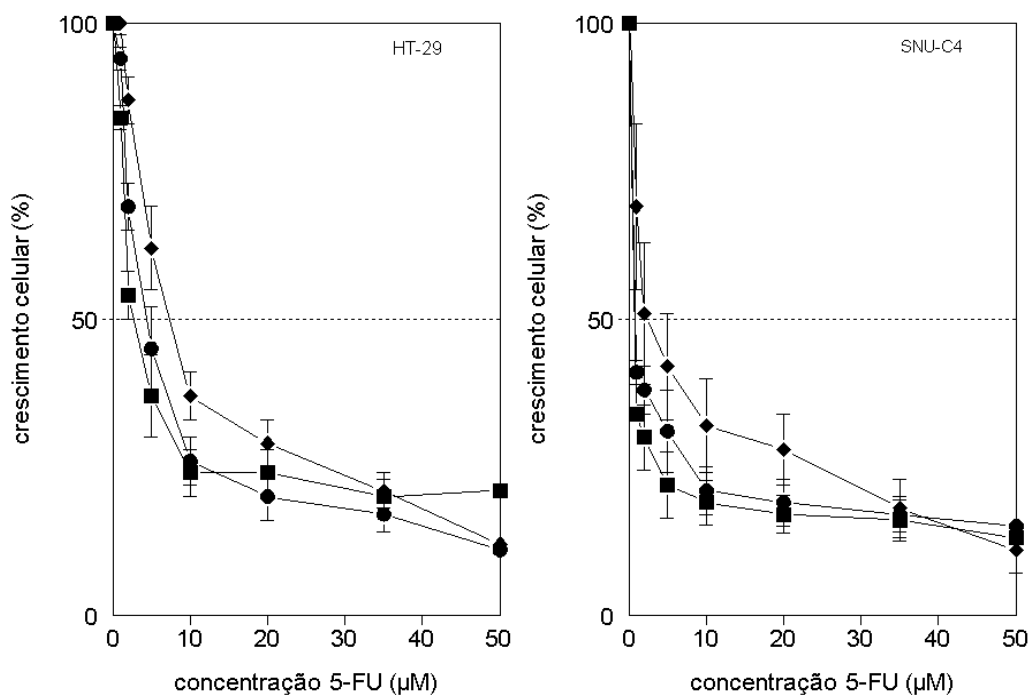


Figura 7: Efeito do tratamento com 5-FU nas linhagens celulares de carcinoma colorretal HT-29 (a) e SNU-C4 (b). Após o tratamento com 5-FU (1-50 µM), as células foram incubadas por 24 h (◆), 48 h (●) e 72 h (■). Os resultados estão expressos como

percentual do crescimento celular *versus* dose do 5-FU dose e foi plotado como média \pm desvio padrão de três diferentes experimentos.

A comparação dos valores de IC_{50} (Figura 7) mostrou que a linhagem celular HT-29 possui resistência relativa ao 5-FU (valores de IC_{50} de $8,2 \mu M \pm 1,3$ em 24h, $7,7 \mu M \pm 1,5$ em 48h e $18,4 \mu M \pm 1,7$ em 72h), enquanto que a linhagem SNU-C4 apresentou grande sensibilidade a este quimioterápico (valores de IC_{50} de $2,2 \mu M \pm 0,7$ em 24h, $1,3 \mu M \pm 0,2$ em 48h e $7,1 \mu M \pm 0,2$ em 72h). Os valores de IC_{50} foram utilizados nas avaliações seguintes.

4.2 Efeito do 5-FU na expressão da ENO2 nas Linhagens Celulares de Carcinoma Colorretal

Considerando as diferentes respostas ao 5-FU observadas nas linhagens celulares estudadas, pretendíamos avaliar a participação da ENO2 na sensibilidade ao 5-FU. No entanto, a expressão do RNAm da enolase 2 não foi detectada em nenhuma das linhagens celulares estudadas.

4.3 Efeito do 5-FU na expressão das MMPs-2 e -9 e TIMPs-1 e -2 nas Linhagens Celulares de Carcinoma Colorretal

A expressão das MMPs -2 e -9 e TIMPs -1 e -2 após tratamento com IC_{50} do 5-FU por 24 h, 48 h e 72 h foram avaliadas por PCR em tempo real. Os RNAs das MMPs -2 e -9 não foram detectados nas linhagens celulares HT-29 e SNU-C4. Por outro lado, os RNAm dos TIMPs -1 e -2 foram detectados nas duas linhagens estudadas. A expressão basal dos TIMPs -1 e -2 não é diferente entre as linhagens células estudadas. O efeito do 5-FU sobre a expressão dos TIMPs

estão expressos na Tabela 3. O ΔC_T foi calculado para os genes alvo TIMP-1 e TIMP-2, utilizando como o gene endógeno, a β -actina. As diferenças nos C_T S do gene de interesse e do controle endógeno foram calculadas para normalizar diferenças na extração de RNA e na eficiência da transcrição reversa.

Tabela 3: Média dos Valores de ΔC_T dos TIMP-1 e TIMP-2.

| | TIMP-1 | | TIMP-2 | |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | HT-29 | SNU-C4 | HT-29 | SNU-C4 |
| Controle não tratado, 24 h | 4.1 | 4.5 | 8.3 | 8.1 |
| Controle não tratado, 48 h | 4.4 | 3.6 | 7.9 | 8.2 |
| Controle não tratado, 72 h | 1.5 | 2.7 | 6.5 | 7.7 |
| IC₅₀ do 5-FU, 24 h | 3.6 | 3.6 | 5.9 | 6.8 |
| IC₅₀ do 5-FU, 48 h | 2.3 | 2.4 | 4.8 | 7.5 |
| IC₅₀ do 5-FU, 72 h | 2.3 | 4.5 | 3.7 | 8.3 |

O 5-FU demonstrou significativo aumento na expressão do TIMP-1 na linhagem HT-29 após 48 h de tratamento ($p > 0,05$). Na linhagem celular SNU-C4, foi observado uma redução na expressão do TIMP-1 após 72 h de tratamento com o 5-FU ($p > 0,05$). A expressão do TIMP-2 foi aumentada pelo 5-FU nos tempos de 48 h e 72 h ($p > 0,05$). Por outro lado, a expressão do TIMP-2 na linhagem SNU-C4 não foi significativamente afetada.

Com base no valor do ΔC_T , onde o ΔC_T de cada amostra foi subtraído do ΔC_T do calibrador resultando no $\Delta\Delta C_T$, a quantidade alvo, normalizada pelo controle endógeno e relativa ao calibrador foi realizado o cálculo do $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Do qual os valores de todas as amostras são expressos como uma diferença de vezes relativa ao calibrador. Os resultados estão representados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ da TIMP-1 e TIMP-2. (Valores normalizados pelo calibrador, a linhagem celular derivada de glioma humano U87-MG).

| | TIMP-1 | | TIMP-2 | |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | HT-29 | SNU-C4 | HT-29 | SNU-C4 |
| Controle não tratado, 24 h | 3,6 | 2,8 | -2,83 | -2,44 |
| Controle não tratado, 48 h | 3,0 | 4,6 | -1,94 | -2,54 |
| Controle não tratado, 72 h | 8,9 | 6,4 | 0,76 | -1,62 |
| IC₅₀ do 5-FU, 24 h | 4,5 | 4,5 | 2,4 | 0,2 |
| IC₅₀ do 5-FU, 48 h | 7,2 | 7,0 | 4,3 | -1,3 |
| IC₅₀ do 5-FU, 72 h | 7,2 | 2,8 | 6,4 | -2,7 |

Na análise geral, após tratamento com 5-FU, a linhagem HT-29 apresentou maior expressão do TIMP-1 e TIMP-2 quando comparada com a linhagem SNU-C4 (mais sensível ao 5-FU). Em ambas as linhagens celulares a expressão do TIMP-1 e TIMP-2 aumentaram em função do tempo, atingindo níveis mais elevados em 72 h, sendo que o maior aumento foi observado na linhagem celular HT-29 (Tabela 4).

Na linhagem celular HT-29, o 5-FU promoveu um aumento na expressão do TIMP-1 de aproximadamente 1,2 vezes após 24 h de tratamento, quando comparado com o controle não tratado. Após 48 h, o 5-FU aumentou a expressão do TIMP-1 para 2,4 vezes em relação ao controle e após 72 h os níveis de expressão voltaram para 1,2 vezes em relação ao controle não tratado. Já na linhagem SNU-C4, o tratamento com 5-FU por 24 h aumentou a expressão do TIMP-1 em aproximadamente 1,5 vezes em relação ao controle não tratado e estes níveis se mantiveram em até 48 h de exposição ao 5-FU. Entretanto, após 72 h de tratamento com 5-FU a linhagem SNU-C4 demonstrou uma redução de 2 vezes na expressão do TIMP-1 (Tabela 4).

A expressão do TIMP-2 após o tratamento com 5-FU aumentou em 4 vezes na linhagem HT-29 nos tempos de 24 h e 48 h. Após 72 h de exposição ao 5-FU, foi observado um aumento de expressão do TIMP-2 de 6 vezes em relação ao controle não tratado. Já na linhagem SNU-C4, o tratamento com 5-FU aumentou em aproximadamente 2 vezes a expressão do TIMP-2 em todos os tempos estudados. Estes resultados sugerem que a expressão do TIMP-1 e TIMP-2 estão associados a resistência ao tratamento com 5-FU nas linhagens celulares estudadas.

5. DISCUSSÃO

O carcinoma colorretal é o responsável pela terceira causa de morte relacionada ao câncer no mundo (*American Cancer Society*, 2009). Este panorama pode ser explicado pela heterogeneidade encontrada neste tipo de tumor, o que dificulta o tratamento desta neoplasia. De fato, o câncer colorretal avançado não apresenta respostas satisfatórias com a terapia convencional (Skibber *et al.*, 2001). O agente quimioterápico mais ativo nesta neoplasia é o antimetabólito 5-FU associado ao LV, produzindo respostas de no máximo 30% (Plate, 2001). Entretanto, somente 40% dos pacientes respondem a esta terapia (Chau e Cunningham, 2002). Tal fato ocorre porque as respostas a esta terapia é comumente limitada pela resistência destas neoplasias. Neste sentido, diversos estudos têm sido desenvolvidos buscando identificar os mecanismos envolvidos na resistência a estas drogas antineoplásicas e desenvolver novas estratégias de tratamento (Pommier *et al.*, 2004).

É amplamente aceito que a resistência intrínseca a medicamentos é um importante fator limitante da curabilidade do câncer colorretal. A quimiorresistência clínica do câncer colorretal é demonstrada em numerosos estudos. A eficácia do 5-FU pode ser reduzida através de diversos mecanismos de resistência. Entre as alterações na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do 5-FU, o principal mecanismo é o aumento da atividade e expressão da enzima timidilato sintase. A resistência ao tratamento com 5-FU pode não depender somente de fatores implicados em mecanismos clássicos (Gemneir *et al.*, 2004), mas também em mecanismos associados ao crescimento celular, apoptose e invasão (Grivicich *et al.*, 2005b). A compreensão da resposta molecular ao tratamento com 5-FU no câncer colorretal pode oferecer novos alvos para uma futura terapia. Com base nestas considerações, no presente trabalho,

foram investigados quais mecanismos moleculares podem estar envolvidos na resistência ao tratamento com o 5-FU.

Nós verificamos que as duas linhagens celulares demonstraram inibição do crescimento celular dependente de dose. Além disso, identificamos que a linhagem celular HT-29 é mais resistente ao tratamento com 5-FU, enquanto que a linhagem SNU-C4 demonstrou maior sensibilidade ao 5-FU. Estes dados estão de acordo com diversos estudos que demonstraram diferenças de susceptibilidade deste agente nas linhagens celulares de câncer colorretal (Mader *et al.*, 1998; Grivicich *et al.*, 2005b). Mais ainda, em um estudo anterior, o nosso grupo demonstrou que o 5-FU induz mais morte celular na linhagem HT-29 quando comparada com a linhagem celular SNU-C4 (Grivicich *et al.*, 2007).

Fatores determinantes da citotoxicidade do 5-FU são amplamente estudados, principalmente a interação com o alvo do quimioterápico (Peters *et al.*, 1995; Mader *et al.*, 1998). Sabe-se que a inibição da TS é um importante mecanismo da citotoxicidade do 5-FU. Diversos autores mostraram que tumores com baixos níveis de expressão da TS apresentam uma maior resposta ao tratamento com o 5-FU (Paradiso *et al.*, 2000). Por outro lado, outros estudos, mostraram que não existe correlação entre sensibilidade ao 5-FU e a atividade ou expressão do RNAm da TS em linhagens celulares de câncer de cólon (Grem *et al.* 2001). Assim, a resistência ao tratamento com 5-FU pode não depender exclusivamente dos mecanismos clássicos (Kitchens *et al.*, 1999), mas também de mecanismos associados com crescimento celular, invasão e morte celular (Violette *et al.*, 2002).

Neste sentido, para elucidar quais fatores estão envolvidos na resistência das linhagens celulares de câncer colorretal ao tratamento com 5-FU, nós comparamos as linhagens celulares HT-29 (resistente) e SNU-C4 (sensível) quanto a expressão da ENO2, MMPs -2 e -9 e TIMPs -1 e -2.

A ENO2 é induzida por hipóxia, uma condição intrínseca dos tumores. Além disso, o gene da ENO2 foi descrito como um fator importante da tumorigênese do câncer colorretal (Yeh *et al.*, 2008). Selga *et al.* (2008) demonstraram uma importante contribuição da ENO2 na resistência do

metotrexato, outro antimetabólito, na linhagem celular HT-29. Porém, no nosso estudo, não encontramos expressão do RNAm da ENO2 na linhagem HT-29, nem na outra linhagem celular estudada (SNU-C4). Este fato pode ser explicado pela diferença de isoformas analisadas nos dois estudos. De fato, nós utilizamos a isoforma gama da ENO2, e, apesar, de a ENO2 ser superexpressa em uma grande variedade de tumores (Durany *et al.*, 1997; Karnak *et al.*, 2005; Scatena *et al.*, 2008), é a isoforma alfa que apresenta maior expressão no câncer colorretal metastático (Katayama *et al.*, 2006).

É sabido que as MMPs -2 e -9 estão associadas com os processos de progressão, invasão, metástases no câncer colorretal (Mook *et al.*, 2004). Recentemente, foi sugerido que o 5-FU pode estar associado com a inibição da invasão e metástase (Abdel-Hamid e Morsy, 2010). No nosso estudo não verificamos expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9 em nenhuma das linhagens celulares utilizadas. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que não detectaram o RNAm das MMP-2, MMP-9 na linhagem HT-29 (Stahtea *et al.*, 2007; Pedersen *et al.*, 2009). A ausência de expressão das MMPs -2 e -9 no nosso estudo pode estar associada a uma baixa tumorigênese das linhagens celulares HT-29 e SNU-C4.

Os inibidores das metaloproteinases de matriz (TIMPs) afetam diversos aspectos da biologia do câncer, desempenhando um papel crucial na sinalização celular através da regulação do crescimento celular, apoptose, invasão, metástase, angiogênese e instabilidade genômica. Níveis elevados do RNAm dos TIMP-1 e TIMP-2 foram demonstrados em diversos tumores incluindo o colorretal (Giaginis *et al.*, 2009). Quando avaliamos a expressão dos TIMPs -1 e -2 observamos uma expressão basal semelhante nas duas linhagens celulares. Além disso, as duas linhagens apresentaram uma maior expressão do RNAm dos TIMPs no tempo de 72 h em cultivo. Esta maior transcrição dos TIMPs pode sugerir uma possível adaptação da linhagem celular às condições de cultura.

O tratamento com 5-FU demonstrou diferenças entre as linhagens celulares na supressão da expressão do RNAm dos TIMPs estudados, sendo que na linhagem HT-29 (relativamente mais resistente ao 5-FU) a expressão dos TIMP-1 e TIMP-2 foi maior que na SNU-C4 (relativamente mais sensível ao 5-FU).

Além disso, o 5-FU demonstrou maior aumento na expressão do TIMP-1 na linhagem HT-29 em 48 h de tratamento com o 5-FU. No tempo de 48 h a linhagem SNU-C4 também teve um pequeno aumento na expressão do TIMP-1, porém, após 72 h, a expressão do TIMP-1 foi reduzida. Esse resultado parece indicar uma tendência de recuperação da expressão para os níveis normais de TIMP-1 após as mudanças causadas inicialmente pelos tratamentos. Redlich *et al.* (2004) em estudo com cultura de fibroblastos do ligamento periodontal, observaram aumento da expressão de TIMP-1 e 2, no período inicial de aplicação de pressão sob as células (após 60 minutos), e o retorno dos níveis normais de expressão após 90 minutos nas mesmas condições.

O aumento do TIMP-1 está associado com a progressão tumoral (Lu *et al.*, 1991) e também com diminuição da resposta ao tratamento quimioterápico no câncer colorretal (Aldulaymi *et al.*, 2010). Assim, apesar de não existirem diferenças basais na expressão do RNAm do TIMP-1 entre as linhagens celulares HT-29 e SNU-C4, o tratamento com 5-FU demonstrou diferente ação nestas linhagens. Na linhagem com relativa resistência (HT-29) observamos um aumento da expressão do TIMP-1 e na linhagem relativamente mais sensível (SNU-C4) esta expressão foi reduzida em tempo de cultura prolongado. Além disso, foi demonstrado que elevados níveis de TIMP-1 no câncer colorretal está associado com pior prognóstico, uma vez que este inibidor pode agir como fator de crescimento (Zeng, et al., 1995; Murashige et al., 1996). Então, o aumento da expressão do TIMP-1 pode estar associado com o efeito reduzido do 5-FU na linhagem celular HT-29. No nosso estudo, apesar da expressão do RNAm do TIMP-2 após exposição ao 5-FU, ter aumentado nas duas linhagens celulares, este aumento foi maior na linhagem HT-29. Neste sentido, foi demonstrado, em pacientes com câncer colorretal, que o nível plasmático de TIMP-1 é um bom marcador para o câncer colorretal, enquanto que o TIMP-2 apresenta limitações (Giaginis *et al.*, 2009).

Em suma, os resultados deste estudo demonstram que a ENO-2 e as MMPs -2 e -9 não estão associadas com a diferença na resposta ao tratamento com o 5-FU nas linhagens celulares HT-29 e SNU-C4. Porém, sugere que os inibidores das metaloproteinases, em especial, o TIMP-1 está envolvido na

sensibilidade ao tratamento com o 5-FU. Assim, podemos propor que o 5-FU aumenta a expressão do TIMP-1 induzindo uma resistência ao tratamento com este quimioterápico na linhagem HT-29. Embora sejam necessários estudos para identificar através de quais mecanismos este fenômeno ocorre, nós sugerimos que o TIMP-1 é um bom candidato como potencial alvo para aumentar a sensibilidade de linhagens celulares de câncer colorretal ao tratamento com o 5-FU.

6. CONCLUSÕES

As linhagens celulares estudadas demonstraram diferente perfil de sensibilidade ao 5-FU, sendo a linhagem HT-29 relativamente mais resistente e a linhagem SNU-C4 relativamente mais sensível.

As linhagens celulares HT-29 e SNU-C4 não expressam ENO2.

As linhagens celulares HT-29 e SNU-C4 não expressam MMP-2 e MMP-9.

O 5-FU aumenta a expressão do TIMP-1 e TIMP-2.

O aumento do TIMP-1 causado pelo tratamento com 5-FU foi maior na linhagem relativamente mais resistente HT-29.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, N.M., MORSY, M.A. Novel Biochemical Pathways for 5-Fluorouracil in Managing Experimental Hepatocellular Carcinoma in Rats. *J Membr Biol*, 2010.

ACCORSI-MENDONÇA, T., PAIVA, K.B., ZAMBUZZI, W.F., CESTARI, T.M., LARA, V.S., SOGAYAR, M.C., TAGA, R., GRANJEIRO, J.M. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. *J Mol Histol.* v. 39, p. 201-8, 2008.

AGUEZNAY, N., BADOUAL, C., HANS, S., GEY, A., VINGERT, B., PEYRARD, S. QUINTIN-COLONNA, F., RAVEL, P., BRUNEVAL, P., RONCELIN, S., LELONGT, B., BERTOGLIO, J., FRIDMAN, W.H., BRASNU, D., TARTOUR, E. Soluble interleukin-2 receptor and metalloproteinase-9 expression in head and neck cancer: prognostic value and analysis of their relationships. *Clin Exper Immunol*, v. 150, p.114-1123, 2007.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4 ed. Porto Alegre. Artmed, 2004.

ALDULAYMI, B., CHRISTENSEN, I.J., SÖLÉTORMOS, G., JESS, P., NIELSEN, S.E., BRÜNNER, N., NIELSEN, H.J. Changes in soluble CEA and TIMP-1 levels during adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *Anticancer Res*, v. 30, p. 233-237, 2010.

ALMEIDA, J.R.C., *Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade*. Atheneu, p. 61-72, 2004.

ALMEIDA, J.R.C., PEDROSA, N.L., LEITE, J.B., FLEMING, T.R.P., CARVALHO, V.H., CARDOSO, A.A.A. Marcadores Tumoriais: Revisão de Literatura. *Rev Bras Cancerol*, v. 53, p. 305-316, 2007.

ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., MONTANARI, A.C., DONNICI, C.L., LOPES, M.T.P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. *Química Nova*, v. 28, p. 118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Statistics for 2009. Disponível em: http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp. Acesso em: 10/02/2010.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Colon and Rectum. In: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York: Springer, p. 113-124, 2002.

ANDRE, T., de GRAMONT, A., The Oncology Multidisciplinary Research Group (GERCOR). An overview of adjuvant systemic chemotherapy for colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*, v. 4, p. S22-S28, 2004.

BAKER, A.H., EDWARDS, D.R., MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, v.19 p. 3719-3727, 2002.

BALBIN, M., FUEYO, A., KNAUPER, V., LOPEZ, J.M., ALVAREZ, J., SANCHEZ, L.M., QUESADA, V., BORDALLO, J., MURPHY, G., LOPEZ-OTIN, C. Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem*, v.276, p.1253-62, 2001.

BATES, S.E., LONGO, D.L. Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Semin Oncol*, v. 14, p. 102-138, 1987.

BOOM, R., SOL, C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, v. 28, p. 495-503, 1990.

BOS, J.L., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R., VERLAAN-DE VRIES, M., VAN BOOM, J.H., VAN DER EB, A.J., VOGELSTEIN, B. Prevalence of ras gene mutation in human colorectal cancers. *Nature*, v. 327, p. 293-297, 1987.

BOYER, J., MCLEAN, E.G., AROORI, S., WILSON, P., MCCULLA, A., CAREY, P.D., LONGLEY, D.B., JOHNSTON, P.G. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res*, v. p. 2158-2167, 2004.

BRINCKERHOFF, C.E., MATRISIAN, L.M., Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.3, p. 207-214, 2002.

BUTLER, G.S., BUTLER, M.J., ATKINSON, S.J., WILL, H., TAMURA, T., VAN WESTRUNM, S.S., CRABBE, T., CLEMENTS, J., DORTHO, M.P. MURPHY, G. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase receptor regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem*, v.273, p.871-880, 1998.

CHANTRAIN, C.F., HENRIET, P., JODELE,S., EMONARD, H., FERON, O., COURTOY, P.J. et al. Mechanisms of pericyte recruitment in tumor angiogenesis: A new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer*, v.42 p. 310-318, 2006.

CHAU, I., CUNNINGHAM, D. Adjuvant therapy in colon cancer: current status and future directions. *Cancer Treat Rev*, v. 28, p.223-236, 2002.

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

COHEN, A.M., MINSKY, B.D., SCHILSKY, R.L. Colon Cancer. In DEVITA, V.T., HELMAN, S., ROSENBERG, S.A. (Eds.). *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott, p. 929-977, 1997.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins Patologia estrutural e funcional. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.281-356;899-912, 2006.

COUSSENS, L.M., WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*, v. 3, p. 895-904, 1996.

CURRAN, S., MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J Pathol*, v. 189, p. 300-308, 1999.

CURRAN, S., MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Eur J Cancer*, v. 36, p. 1621-1630, 2000.

DE CASTRO-CARPEÑO, J., BELDA-INIESTA, C., CASADO SÁENZ, E., HERNÁNDEZ AGUDO, E., FELIU BATLLE, J., GONZÁLEZ BARÓN, M. EGFR and colon cancer: a clinical view. *Clin Transl Oncol* v. 10, p. 6-13, 2008.

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

DURANY, N., JOSEPH, J., CAMPO, E., MOLINA, R., CARRERAS, J. Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase and enolase activity and isoenzymes in lung, colon and liver carcinomas. *Br J Cancer*, v. 75, p. 969-977, 1997.

EGEBLAD, M. WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, v. 3, p. 161-174, 2002.

FEARON, E.R., GRUBER, S.B. Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In: MENDELSON, J., HOWLEY, P.M., ISRAEL, M.A., LIOTTA, L.A. (Eds.). *The molecular basis of cancer*. WB Saunders Company: Philadelphia, p. 289-312, 2001.

FERNANDES, L.C & MATOS, D. Marcadores tumorais no câncer colorretal. *Rev Col Bras Cir*, v. 29, p. 106-111, 2002.

FORSYTH, P.A., WONG, H., LAING, T.D., REWCASTLE, N.B., MORRIS, D.G., MUZIK, H., LECO, K.J., JOHNSTON, R.N., BRASHER, P.M., SUTHERLAND, G., EDWARDS, D.R. Gelatinase A (MMP-2), gelatinase B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer*, v. 79, p.1828-35, 1999.

FREIJE, J.M., DIEZ-ITZA, I., BALBIN, M., SANCHEZ, L.M., BLASCO, R., TOLIVIA, J., LOPEZ-OTIN, C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*, v. 269, p.16766-16773, 1994.

GALLEGO, R., CODONY-SERVAT, J., GARCÍA-ALBÉNIZ, X., CARCERENY, E., LONGARÓN, R., OLIVERAS, A., TOSCA, M., AUGÉ, J.M., GASCÓN, P., MAUREL, J. Serum IGF-I, IGFBP-3, and matrix metalloproteinase-7 levels and acquired chemo-resistance in advanced colorectal cancer. *Endocr Relat Cancer*, v. 16, p. 311-317, 2009.

GHILARDI, G., BIONDI, M.L., MANGONI, J., LEVITI, S., DEMONTI, M., GUAGNELLINI, E., SCORZA, R. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res*, v. 7, p. 2344-2346, 2001.

GIAGINIS, C., NIKITEAS, N., MARGELI, A., TZANAKIS, N., RALLIS, G., KOURAKLIS, G., THEOCHARIS, S. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2 (TIMP-1 and TIMP-2) levels in colorectal cancer patients: associations with clinicopathological variables and patient survival. *Int J Biol Markers*. v. 24, p. 245-252, 2009.

GIANCOTTI, F.G., RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. *Science*, v. 285, p. 1028-1032, 1999.

GIOVANNETTI, E., BACKUS, H.H., WOUTERS, D., PETERS, G.J. Functional inactivity and mutations of p53 differentially affect sensitivity to 5-fluorouracil and antifolate inhibitors of thymidylate synthase (TS) by altering TS levels in colorectal cancer cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, v. 27, p. 740-745, 2008.

GMEINER, W.H., TRUMP, E., WEI, C. Enhanced DNA-directed effects of FdUMP[10] compared to 5FU. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, v. 23, p. 401-410, 2004.

GOMES, F.R., Marcadores tumorais (alcances e limites). *Acta Med Port*, v. 10, p. 75-80, 1997.

GOMEZ, D.E., ALONSO, D.F., YOSHIJI, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, v. 74, p. 111-112, 1997.

GREM, J.L. Fluoropyrimidines. In: CHABNER, B.A., LONGO, D.L. (Eds.). *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. Lippincott-Raven Philadelphia, p. 149-212, 1996.

GREM, J.L., DANENBERG, K.D., BEHAN, K., PARR, A., YOUNG, L., DANENBERG, P.V., NGUYEN, D., DRAKE, J., MONKS, A., ALLEGRA, C.J. Thymidine kinase, thymidylate synthase, and dihydropyrimidine dehydrogenase profiles of cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen. *Clin Cancer Res*, v. 7, p. 999-1009, 2001.

GRIVICICH, I., REGNER, A., da ROCHA, A.B., GRASS, L.B., ALVES, P.A., KAYSER, G.B., SCHWARTSMANN, G., HENRIQUES, J.A. Irinotecan/5-fluorouracil combination induces alterations in mitochondrial membrane potential and caspases on colon cancer cell lines. *Oncol Res*, v. 15, p. 385-392, 2005b.

GRIVICICH, I., da ROCHA, A.B., PETERS, G.J., SCHWARTSMANN, G. Treatment Of Advanced Colorectal Cancer: Current Status and Future Perspectives In: MARTINEZ, J.D. (Ed.) *Focus on Colorectal Cancer Research*. Nova Science Publishers, p. 171-208, 2005a.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ZANONI, C., CORREA, L.P., JOTZ, G.P., HENRIQUES, J.A., SCHWARTSMANN, G., da ROCHA, A.B. Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. *Int J Colorectal Dis*, v. 22, p. 1201-1208, 2007.

HAHN, W.C., WEINBERG, R.A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 331-341, 2002

HALLER, D.G. Chemotherapy in gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol*, v. 15, p. 50-64, 1998.

HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, v. 6, p. 986-94, 1996.

HESLIN, M.J., YAN, J., JOHNSON, M.R., WEISS, H., DIASIO, R.B., URIST, M.M. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Sur*, v. 233, p. 786-79, 2001.

HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R., GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Academic Sci USA*, v.16, p. 7276- 7280, 1991

HOUGHTON, J.A., HARWOOD, F.G., TILLMAN, D.M. Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via Fas signaling. *Proc Natl Academic Sci USA*, v. 94, p. 8144-8149, 1997.

HUERTA, S. Recent advances in the molecular diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 8, p. 277-288, 2008.

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

JONES, R.G. & THOMPSON, C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*, v. 23, p. 537-548, 2009.

JUCÁ, M., NUNES B.L.B.B.P., MENEZES, H.L., GOMES, E.G.A., MATOS, D., Metaloproteinases 1 e 7 e Câncer Colorretal. *Rev Bras Coloproct*, v. 28, p. 353-362, 2008.

KARNAK, D., BEDER, S., KAYACAN, O., IBIS, E., OFLAZ, G. Neuron-specific enolase and lung cancer. *Am J Clin Oncol*, v. 28, p. 586-590, 2005.

KATAYAMA, M., NAKANO, H., ISHIUCHI, A., WU, W., OSHIMA, R., SAKURAI, J., NISHIKAWA, H., YAMAGUCHI, S., OTSUBO, T. Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg Today*, v. 36, p. 1085-1093, 2006.

KIM, Y.S., MILNER, J.A. Dietary modulation of colon cancer risk. *J Nutr*, v. 137, p. 2576S-2579S, 2007.

KITCHENS, M.E., FORSTHOEFEL, A.M., BARBOUR, K.W., SPENCER, H.T., BERGER, F.G. Mechanisms of acquired resistance to thymidylate synthase inhibitors: the role of enzyme stability. *Mol Pharmacol*, v.56, p. 1063-1070, 1999.

KONISHI, T., SASAKI, S., WATANABE, T., KITAYAMA, J., NAGAWA, H. Overexpression of hRFI inhibits 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells via activation of NF-kappaB and upregulation of BCL-2 and BCL-XL. *Oncogene*, v. 25, p. 3160-3169, 2006.

KRAIEM, Z., KOREM, S. Matrix metalloproteinases and the thyroid. *Thyroid*, v. 10, p. 1061-1069, 2000.

LEEMAN, M.F., CURRAN, S., MURRAY, G.I. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol*, v. 201, p. 528-534, 2003.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers, Inc. 4 ed, p. 530-534, 2005.

LIMA, J.E., TAKAYANAGUI, O.M., GARCIA, L.V., LEITE, J.P. Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological disorders. *Braz J Med Biol Res*, v.1, p. 19-26, 2004.

LIVAK, K.J., FLOOD, S.J.A., MARMARO, J., GIUSTI, W., DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, v. 4, p. 357-62, 1995.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

LO, Y.M., RAINER, T.H., CHAN, L.Y., HJELM, N.M., COCKS, R.A. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*, v. 46, p. 319-323, 2000.

LU, X., Levy, M., Weinstein, I.B., Santella, R.M. Immunological quantitation of levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human colon cancer. *Cancer Res*, v.51, p. 6231-6235, 1991.

LUNGE, V.R., MILLER, B.J., LIVAK, K.J., BATT, C.A. Factors affecting the performance of 5' nuclease PCR assays for *Listeria monocytogenes* detection. *J Microbiol Meth*. v. 51, p. 361-368, 2002.

- MACHADO, A.E.D. Química Nova. v.23. p.237. 2000.
- MADER, R.M., MULLER, M., STEGER, G.G. Resistance to 5-Fluorouracil. *Gen Pharmacol*, v. 31, p. 661-666, 1998.
- MANDEL, H.G. The target cell determinants of the antitumor actions of 5-FU: does FU incorporation into RNA play a role? *Cancer Treat Rep*, v. 3, p.63-71, 1981.
- MARANGOS, P.J., GAZDAR, A.F., CARNEY, D.N. Neuron-specific enolase in human small cell carcinoma cultures. *Cancer Lett*, v. 15, p.67-71, 1982.
- MARANGOS, P.J., ZOMZELY-NEURATH, C., GOODWIN, F.K.J. Structural and immunological properties of neuron specific protein (NSP) from rat, cat and human brain: comparison to bovine 14-3-2. *J Neurochem*, v. 28, p. 1097-1007, 1977.
- MARQUES, E.K., (org.). Diagnóstico Genético e Molecular. Canoas. Ed. Ulbra. 2003.
- MARTIN, M.D., MATRISIAN, L.M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, v. 26, p. 717-724, 2007.
- MATRISIAN, L.M. Metalloproteinases and inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*, v. 6, p.121-125, 1990.
- MATUO, R., SOUSA, F.G., ESCARGUEIL, A.E., SOARES, D.G., GRIVICICH, I., SAFFI, J., LARSEN, A.K., HENRIQUES, J.A. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochem Pharmacol*, v. 79, p. 147-153, 2010.
- MCCAWLEY, L.J., MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Curr Opin Cell Biol*, v.13, p. 534-540, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de programas de controle de câncer - pro-onco. O problema do câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em: 15/10/2009.

MOLLER, P., KORETZ, K., LEITHAUSER, F., BRUDERLEIN, S., HENNE, C., QUENTMEIER, A., KRAMMER, P.H. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer*, v. 57, p. 371-377, 1994.

MOOK, O.R., FREDERIKS, W.M., VAN NOORDEN, C.J. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, v. 17, p. 69-89, 2004.

MOORE, B.W., MCGREGOR, T. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem*, v. 240, p.1647-1653, 1965.

MURAD, A.M., KATZ, A. Oncologia Bases Clínicas do Tratamento. Guanabara. Rio de Janeiro, p. 41, 2000.

MURASHIGE, M., MIYAHARA, M., SHIRAIISHI, N., SAITO, T., KOHNO, K., KOBAYASHI, M. Enhanced Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Human Colorectal Tumors. *Jpn J Clin Oncol*, v. 26, p. 303-309, 1996.

MURPHY, G., KNAUPER, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the homopexin domain? *Matrix Biol*, v. 15, p. 511-518, 1998.

MUTCH, M.G. Molecular profiling and risk stratification of adenocarcinoma of de colon. *J Sur Oncol*, v. 96, p. 693-703, 2007.

OLIVEIRA, R.B., ALVES, R.J. Química Nova. v.25, p.976. 2002.

OVERALL, C.M., LOPEZ-OTIN, A. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovatios for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 657-672, 2002.

PACHECO, F.A., PASCHOAL, M.E., CARVALHO, M.G.C. Marcadores Tumorais no Câncer de Pulmão: um caminho para a terapia biológica. *J Pneumologia*, v. 28, p. 143-149, 2002.

PARADISO, A., SIMONE, G., PETRONI, S., LEONE, B., VALLEJO, C., LACAVA, J., ROMERO, A., MACHIAVELLI, M., DE LENA, M., ALLEGRA, C.J., JOHNSTON, P.G. Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, v. 82, p. 560-567, 2000.

PARKS, W.C., WILSON, C.L., LOPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 4, p. 617-629, 2004.

PEDERSEN, G., SAERMARK, T., KIRKEGAARD, T., BRYNSKOV, J. Spontaneous and cytokine induced expression and activity of matrix metalloproteinases in human colonic epithelium. *Clin Exp Immunol*, v. 155, p. 257-265, 2009.

PELLEGRINI, P., CONTASTA, I., BERGHELLA, A.M., GARGANO, E., MAMMARELLA, C., ADORNO, D., Simultaneous measurement of soluble carcinoembryonic antigen and tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP1 serum levels for use as maker pre-invasive colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, v. 49, p. 388-394, 2000.

PETERS, G.J., VAN DER WILT, C.L., VAN TRIEST, B., CODACCI-PISANELLI, G., JOHNSTON, P.G., VAN GROENINGEN, C.J., PINEDO, H.M. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer*, v. 31A, p. 1299-1305, 1995.

PLATE, S. ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of colon cancer. *Ann Oncol*, v. 12, p. 1053-1054, 2001.

POMMIER, Y., SORDET, O., ANTONY, S., HAYWARD, R.L., KOHN, K.W. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, v. 23, p. 2934-2949, 2004.

POULSOM, R., PIGNATELLI, M., STETLER-STEVENSON, W.G., LIOTTA, L.A., WRIGHT, P.A., JEFFERY, R.E., LONGCROFT, J.M., ROGERS, L., STAMP, G.W. Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol*, v. 141, p. 289-296, 1992.

RAO, V.H., LEES, G.E., KASHTAN, C.E., NEMORI, R., SINGH, R.K., MEEHAN, D.T., RODGERS, K., BERRIDGE, B.R., BHATTACHARYA, G., COSGROVE, D. Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV collagenases/gelatinases), and MT1-MMP in canine X-linked Alport syndrome (XLAS). *Kidney Int*, v. 63, p. 1736-1748, 2003.

REDLICH, M., ROOS, H., REICHENBERG, E., ZAKS, B., GROSSKOP, A., BAR KANA, I., PITARU, S., PALMON, A. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and beta-actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res*. v. 39, p. 27-32, 2004.

REIS, F.J.C. Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário: papel dos marcadores tumorais. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 27, p. 222-227, 2005.

RUPNARAIN, C., DLAMINI, Z., NAICKER, S., BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem*, v. 385, p. 449-464, 2004.

SALMON, S.E. Farmacologia Básica e Clínica. Ed. Guanabara Koogan. p. 629-655. Rio de Janeiro. 1998.

SAWAYA, R.E., YAMAMOTO, M., GOKASLAW, Z.L., WANG, S.W., MOHAMAM, S., FULLER, G.N., McCUTCHEON, I.E., STETLER-STEVENSON, W.G., NICOLSON, G.L., RAO, J.S. Expression and localization of 72KDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis*, v. 14, p. 35-42, 1996.

SCATENA, R., BOTTONI, P., PONTOGLIO, A., MASTROTOTARO, L., GIARDINA, B. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 17, p. 1533-1545, 2008.

SCHMECHEL, D., MARANGOS, P.J., BRIGHTMAN, M. Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature*, v. 276, p. 834-836, 1978.

SCHUETZ, J.D. & DIASIO, R.B. The effect of 5-fluorouracil on DNA chain elongation in intact bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 133, p. 361-367, 1985.

SECOLI, S.R., TONON, L.M., CAPONERO, R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. *Rev Bras Cancerol*, v. 53, p. 173-182, 2007.

SELGA, E., MORALES, C., NOÉ, V., PEINADO, M.A., CIUDAD, C.J. Role of Caveolin 1, E-Cadherin, Enolase 2 and PKCalpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells. *BMC Med Genomics*, v. 1, p. 35, 2008.

SILVEIRA, A.S. Câncer Ginecológico: Diagnóstico e Tratamento. In: GIL R.A. Fatores Prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico. UFSC, p.135-52, 2005.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D. New colorimetric assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst*, v. 83, p. 1107-1112, 1990.

SKIBBER, J.M., MINSKY, B.D., HOFF, P. Cancer of the colon. In: DEVITA, V.T., HELLMAN, S. ROSENBERG, A.S. (Eds.) *Cancer: principles and practice of oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1216-1270, 2001.

SOBIN, L.H., WITTEKIND, C.H. (ed). *Classification of Malignant Tumours*. International Union Against Cancer. 6th ed., p. 77-81, 2004.

SORSA, T., TJADERHANE, L., KONTTINEN, Y.T., LAUHIO, A., SALO, T., LEE, H.M., GOLUB, L.M., BROWN, D.L., MÄNTYLÄ, P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*, v. 38, p. 306-321, 2006.

SPENCE, R.A.J., JONHSTON, P.G. *Oncology*. Oxford. p. 1-14, 1996

STAHTEA, X.N., ROUSSIDIS, A.E, KANAKIS, I., TZANAKAKIS, G.N., GHALKIADAKIS, G., MAVROUDIS, D., KLETSAS, D., KARAMANOS, N.K. Imatinib inhibits colorectal cancer cell growth and suppresses stromal-induced growth stimulation, MT1-MMP expression and pro-MMP2 activation. *Int J Cancer*, v. 121, p. 2808-2814, 2007.

SUN, W., HALLER, D.G. Adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol*, v. 32, p. 95-102, 2005.

TAPIA, F.J., POLAK, J.M., BARBOSA, A.J.A., BLOOM, S.R., MARANGOS P.J., DERMODY C., PEARSE, A.G. Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet*, v. 1, p. 808-811, 1981.

UCHIDA, M., SHIMA, M., SHIMOAKA, T., FUJIEDA, A., OBARA, K., SUZUKI, H., NAGAI, Y., IKEDA, T., YAMATO, H., KAWAGUCHI, H. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol*, v. 185, p. 207-214, 2000.

VIOLETTE, S., POULAIN, L., DUSSAULX, E., PEPIN, D., FAUSSAT, A.M., CHAMBAZ, J., LACORTE, J.M., STAEDL, C., LESUFFLEUR, T. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer*, v. 98, p. 498-504, 2002.

VOGELSTEIN, B., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R., KERN, S.E., PREISINGER, A.C., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., WHITE, R., SMITS, A.M., BOS, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, v. 319, p. 525-532, 1988.

WICK, W., PCATTEN, M., WELLER, M. Glioma cell invasion regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol*, v. 53, p. 177-185, 2001.

WOESSNER, J.F.JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*, v. 5, p. 2145-2154, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <http://emro.who.int/ncd/publications/worldcancerreport.pdf>. Acesso em: 09/12/2009.

WU, A.W., GU, J., JI, J.F., LI, Z.F., XU, G.W. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol*, v. 9, p. 1990-1994, 2003.

YANA, I. SEIKI, M. MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination. *Clin Exp Metastasis*, v. 19, p. 209-215, 2002.

YEH, C.S., WANG, J.Y., CHUNG, F.Y., LEE, S.C., HUANG, M.Y., KUO, C.W., YANG, M.J., LIN, S.R. Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncol Rep*, v. 19, p. 81-91, 2008.

YONG, V. W., KREKOSKI, C.A., FORSYTH, P.A., BELL, R., EDWARDS, D.R. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci*, v. 21, p. 75-80, 1998.

ZENG, Z.S., COHEN, A.M., ZHANG, Z.F., STETLER-STEVENSON, W., GUILLEM, J.G. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res*, v. 1, p. 899-906, 1995.

ZENG, Z.S., HUANG, Y., COHEN, A.M., GUILLEM, J.G. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol*, v. 14, p. 3133-3140, 1996.

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](#)