

UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

LIVIA BACELAR DE JESUS

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



ESTUDO BIOQUÍMICO E FUNCIONAL DA PROTEÓLISE DE LAMININA INDUZIDA POR CÉLULAS DE GLIOMA C6

Salvador
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

LIVIA BACELAR DE JESUS

**ESTUDO BIOQUÍMICO E FUNCIONAL DA PROTEÓLISE DE
LAMININA INDUZIDA POR CÉLULAS DE GLIOMA C6**

Salvador
2015

LIVIA BACELAR DE JESUS

**ESTUDO BIOQUÍMICO E FUNCIONAL DA PROTEÓLISE DE
LAMININA INDUZIDA POR CÉLULAS DE GLIOMA C6**

Dissertação apresentada ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas como pré-requisito para obtenção de título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Freire Santos da Cunha.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa.

Salvador
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

J58 Jesus, Livia Bacelar de,
Estudo bioquímico e funcional da proteólise de laminina induzida por células de glioma C6 / por Livia Bacelar de Jesus. – 2015.
53 f.

Orientador: Prof. Dr.^a Elisabete Freire Santos da Cunha.
Coorientadora: Prof. Dr.^a Maria de Fátima Dias Costa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2015.

1. Cérebro - Tumores. 2. Gliomas. 3. Enzimas proteolíticas. 4. Oncologia. I. Cunha, Elisabete Freire Santos da. II. Costa, Maria de Fátima Dias Costa. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Instituto de Ciências da Saúde. V. Título.

CDD – 616.994 81

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

LÍVIA BACELAR DE JESUS

**ESTUDO BIOQUÍMICO E FUNCIONAL DA PROTEÓLISE DE LAMININA INDUZIDA
POR CÉLULAS DE GLIOMAS C6**

Salvador, Bahia, 04 de dezembro de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA DIAS COSTA (Examinador Interno)

PROF. DR. RAMÓN DOS SANTOS EL-BACHÁ (Examinador Interno)

PROF. DR. DIEGO MADUREIRA DE OLIVEIRA (Examinador Externo)

LIVIA BACELAR DE JESUS

**ESTUDO BIOQUÍMICO E FUNCIONAL DA PROTEÓLISE DE
LAMININA INDUZIDA POR CÉLULAS DE GLIOMA C6**

Dissertação apresentada ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas como pré-requisito para obtenção de título de mestre.

Aprovada em 04 de dezembro de 2015.

Banca Examinadora

Elisabete Freire Santos da Cunha - Orientadora
Doutorada em Química Biológica pelo Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ.
Professora do Departamento de Biofunção da Universidade Federal da Bahia.

Maria de Fátima Dias Costa – Coorientadora
Pós-doutorado pela Universidade Paris-Val-de-Marne.
Doutora em Neurociências pela Universidade de Paris XII.
Professora Titular de Bioquímica Médica vinculada à Universidade Federal da Bahia.

Ramon dos Santos El-Bachá
Doutorado em Ciências do Medicamento pela Universidade Henri Poincaré.
Professor associado IV da Universidade Federal da Bahia.

Diêgo Madureira de Oliveira
Doutorado em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia.
Professor Adjunto III da Universidade de Brasília.

À minha mãe, Dona Marinalva por todo esforço em prol
da minha educação e por mostrar-me a beleza da
simplicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser sempre o meu refúgio, minha fortaleza e por permitir que eu concluísse mais essa etapa com equilíbrio e sabedoria. A ele toda honra e toda glória.

À Profª Drª Elisabete Freire, pela orientação, paciência e confiança. Obrigada por acreditar em meu potencial e me ensinar que ciência também é poesia, é beleza e leveza. Meus sinceros agradecimentos professora, por ser exemplo de profissional e ser humano que eu quero seguir, pelos os ensinamentos diários e por compactuar comigo nesse desafio.

À Profª Drª Maria de Fátima Costa Dias, minha coorientadora, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e acreditar em mim desde o período de iniciação científica. Obrigada pelas oportunidades e experiências durante toda essa caminhada.

À minha parceira de experimento Maria Socorro Grangeiro, ou simplesmente Help, por me ajudar nessa caminhada. Sua paciência me conduziu nos momentos mais cruciais e auxiliou-me para a finalização desse trabalho.

Aos meus companheiros de bancada Fillipe Mendes e Rafael Short, por toda a alegria, desesperos e sorrisos compartilhados ao longo desse período.

Ao Alex Barbosa e a sua esposa Rosalina, pela amizade e conselhos.

À Profª Drª Silvia Lima Costa, Prof. Dr. Ramon El-Bachá e Prof. Dr. Victor Diogenes, pela disponibilidade e incentivos dados nessa caminhada.

Aos meus amigos Adson Martins, Camylla Vilas Boas, Rodrigo Mota, Táris Maria, que sempre me estimularam a seguir firme e perseverante nessa caminhada. Agradeço a força que recebi nos dias de lamentos e reclamações.

Aos meus familiares que sempre entenderam minhas ausências e festejaram junto comigo cada conquista e realização.

Aos meus amigos Mário Oliveira, Magda Pedrita e Maraíze Gomes, por não me deixarem esquecer que existe vida fora do laboratório. Obrigada por essa amizade! É muito bom saber que sempre posso contar com vocês.

Aos membros do laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, pelo convívio e emoções vividas. Em especial, agradeço à Lúcia, Keu e Verônica que facilitaram bastante a realização dos meus experimentos.

As alunas de iniciação científica Bianca, Cecília, Emily e Tatiana, pelas gargalhadas e ajudas que não foram poucas.

À Fundação Oswaldo Cruz, pela parceria e disponibilidade para o uso dos seus equipamentos quando solicitado.

Ao Prof. Roberto Paulo, coordenador do Programa de pós-graduação em Processos Interativo dos Órgãos e Sistemas e aos funcionários Célia e Marcelo, pela disposição e boa vontade em ajudar.

À Capes e ao CNPq pelo financiamento concedido.

E por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse estudo.

“Para ser grande, sê inteiro.
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

Jesus, Livia Bacelar de. **Estudo bioquímico e funcional da proteólise de laminina induzida por células de glioma C6**. 2015. 53 f. il. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Os glioblastomas são tumores cerebrais com alto potencial de crescimento, sendo responsáveis por um prognóstico de sobrevida de 9 a 11 meses. De forma geral, o crescimento tumoral encontra-se relacionado à degradação de componentes da matriz extracelular (MEC). Especificamente para os gliomas, o potencial invasivo tem sido relacionado ao aumento da expressão da metaloprotease do tipo 9 (MMP-9). Recentemente, tem sido mostrado que a proteólise de componentes da matriz extracelular promove a liberação de fragmentos protéicos com atividade biológica distinta da apresentada pela molécula intacta. Existem poucas informações sobre o efeito da proteólise de laminina-111 (LMN-111), proteína de matriz extracelular, no contexto do sistema nervoso central. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo investigar se o meio condicionado por células de gliomas C6 (MCC6) apresenta atividade proteolítica sobre polímeros de LMN-111. Utilizando zimografia acoplada à eletroforese, detectamos a presença de uma gelatinase de 110 kDa em MCC6. A atividade proteolítica do MCC6 sobre polímeros de LMN foi observada através de imunomarcagem para LMN-111 e de análise por eletroforese. A incubação dos polímeros de LMN-111 com MCC6 resultou em três fragmentos de 70, 45 e 30 kDa. Dessa forma, os resultados mostram a presença de fragmentos proteolíticos de LMN-111, gerados pelo tratamento dos polímeros com MCC6 e sugerem a necessidade de estudos posteriores para a caracterização da atividade biológica associada aos mesmos.

Palavras-chave: Laminina. Glioma. Proteólise. Metaloprotease.

Jesus, Livia Bacelar de. **Biochemical and functional study of laminin proteolysis induced by C6 glioma cells.** 2015. 53 pp. ill. Master – Dissertation - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

The glioblastomas are cerebral tumours with high potential of growth, presenting a prognostic of survival from 9 to 11 months. Generally, the growth is related to the degradation of the extracellular matrix (ECM). The invasive potential of the human gliomas has been related to the increase in the expression of metalloprotease type 9 (MMP-9). Recently, it has been showed that the proteolysis of the ECM components promote the release of protein fragments with biological activity different from the biological activity of the whole molecule. There are few information related to the effect of laminin's proteolysis regarding the nervous system. Thus, the aim of the study is to investigate if conditioned medium with C6 glioma cells presents proteolytic activity on polymers of LMN-111. Using zymography coupled with electrophoresis was detected a 110 kDa gelatinase in MCC6. The proteolytic activity of MCC6 on LMN-111 polymers was observed through immunolabeling and electrophoresis analyses. The incubation of the polymers of LMN-111 with MCC6 resulted in three fragments of 70, 45, and 30 kDa, respectively. Thus, the results show the presence of proteolytic fragments of LMN-111 generated by the treatment of the protein polymers with MCC6 and suggest the need for further studies to characterize the biological activity associated to them.

Keywords: Laminin. Glioma. Proteolysis. Metalloprotease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático da LMN-111, com seus domínios LN, L4, LE e LG e as diferenças estruturais entre os subtipos das cadeias α , β e γ	20
Figura 2	Microscopia eletrônica, utilizando a técnica de sombreamento rotatório	23
Figura 3	Desenho esquemático ilustrando a participação do receptor no processo de polimerização da LMN	25
Figura 4	Zimografia do MCC6	35
Figura 5	Imunocoloração para matrizes de laminina obtidos por diluição da proteína em tampão	36
Figura 6	Eletroforese de lmn solúvel polimerizada em tampão ácido após tratamento com mcs	37
Figura 7	Imunocitoquímica para laminina intra e extracelular em células C6	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
C6	Linhagem celular imortalizada de tumores cerebrais de rato derivada de astrocitoma grau IV
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CO_2	Dioxido de carbono
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco Modificado por Meio de Eagle
DMEM-F12	Dulbecco Modificado por Meio de Eagle tipo F12
G	Gravidade
GB	Glioblastoma
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Quilodalton
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
LMN	Laminina
LMN-111	Laminina -111
MB	Membrana Basal
MC	Meio Condicionado
MCA _s	Meio Condicionado por Astrócitos (vou padronizar)
MCAST	Meio Condicionado por Astrócitos
MCC6	Meio Condicionado por Células C6
MCT	Meio Controle
MEC	Matriz Extracelular
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMP	Metaloprotease de Matriz
MMP-9	Metaloprotease de Matriz do tipo 9
mV	Milivolts
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
P0	Ratos recém nascidos dia 0

PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PM	Peso Molecular
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TpAcNa	Tampão acetato de sódio
Tris/HCl	Trisaminometano/ ácido clorídrico
ZnCl ₂	Cloreto de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	GLIOMAS	17
2.2	METALOPROTEASES	18
2.3	MEMBRANAS BASAIS	16
2.4	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA LMN	21
2.5	DOMÍNIOS PROTEICOS DA LAMININA E SUAS FUNÇÕES	23
2.6	POLIMERIZAÇÃO DA LAMININA	24
2.7	POLÍMEROS DE LAMININA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	27
2.8	PROTEÓLISE DE POLÍMEROS DE LAMININA E RESPOSTAS CELULARES	29
3	HIPÓTESE	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	MATERIAIS E METÓDOS	33
5.1	OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DE GLIOMA C6	33
5.2	OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR ASTRÓCITOS	33
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE GELATINASE NO MCS	34
5.4	TRATAMENTO DE MATRIZES DE LAMININA COM MCS	34
5.5	TRATAMENTO DE POLÍMEROS DE LAMININA COM MCS	35
5.6	DIGESTÃO DA LAMININA E CARACTERIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE LAMININA POR ELETROFORESE	35

5.7	VISUALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LAMININA POR CÉLULAS DE GLIOMA C6 E POR ASTRÓCITOS	35
5.8	IMUNOMARCAÇÃO	36
6	RESULTADOS	37
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINÁSICA	37
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO MCC6 SOBRE POLÍMERO DE LAMININA	38
6.3	AVALIAÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA DAS CÉLULAS C6 SOBRE LMN	40
7	DISCUSSÃO	41
8	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A membrana basal (MB) é um tipo de matriz extracelular (MEC) especializada que apresenta forma laminar, sendo composta principalmente pelo proteoglicano perlecan e pelas proteínas: laminina, colágeno do tipo IV, fibronectina e nidogen (TANZER, 2006). Nos animais, os órgãos e tecidos apresentam uma arquitetura organizada contendo células aderentes a uma MB subjacente. As membranas basais encontram-se, portanto na interface entre células parenquimatosas e os tecidos de sustentação, mais especificamente, são encontradas abaixo da superfície basal de todos os epitélios, em torno dos adipócitos, das células musculares, nos glomérulos renais e em torno dos vasos sanguíneos (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013). No Sistema Nervoso Central (SNC) é elemento importante na formação da barreira hematoencefálica (ROBERTS et al., 2012).

A MB funciona, a priori, como uma barreira mecânica para os solutos grandes, sendo impenetrável para a maioria das células (YURCHENCO; PATTON, 2009). Alterações em sua arquitetura molecular e conseqüentemente em sua permeabilidade são detectadas tanto em processos inflamatórios, quanto no crescimento e na migração de células tumorais. Nessas situações, evidenciam-se variações na expressão e degradação proteolítica dos seus constituintes moleculares (ROBERTS et al., 2012). Esses eventos envolvem a integração de processos bioquímicos intra e extracelulares, incluindo a ação de metaloproteases de matriz (MMPs) (ESTEVE et al., 1998; NAKADA et al., 2006). As MMPs constituem uma família de proteases extracelulares solúveis ou ligadas à membrana, dependentes de Zinco e/ou cálcio, que coletivamente podem degradar ou modificar proteoliticamente os componentes da matriz extracelular incluindo colágeno IV, laminina, e proteoglicanos (GU et al., 2005; ESTEVE et al., 1998; MIRAGLIA et al., 2013).

Os gliomas são os tumores primários mais frequentes e mais malignos entre as neoplasias do SNC por apresentar crescimento rápido, produzir destruição de extensas áreas do tecido nervoso e provocar edema intenso. O prognóstico é ruim e a maioria dos pacientes sobrevive no máximo 18 meses após confirmação do diagnóstico (SATHORNSUMETEE et al., 2007). Os astrocitomas (tumores derivados de astrocitos) correspondem a aproximadamente 80 % dos gliomas, sendo o glioblastoma (GB), astrocitoma grau IV, a forma mais comum e mais maligna entre os tumores cerebrais primários (PAVON et al., 2012). Uma das características dos GB é sua habilidade de infiltrar-se e invadir os tecidos circundantes, fenômeno que deriva de sua capacidade de produzir MMPs.

A degradação de elementos da matriz é responsável por produzir alterações na arquitetura da MB com perda no controle do fluxo molecular e celular. Além disso, consiste em evento relevante para a expansão tumoral. Por outro lado, os produtos de proteólise dos elementos da MEC por MMPs, ou seja, os fragmentos proteolíticos podem apresentar capacidade modulatória sobre as células tumorais e sobre as células do próprio tecido. A literatura mostra alguns dados que evidenciam essa possibilidade: 1) A proteólise da região C-terminal do domínio V de perlecan, após acidente vascular cerebral, gera um fragmento que atua como neuroprotetor e promotor de reparação pós-derrame cerebral (ROBERTS et al., 2012); 2) A clivagem proteolítica de colágeno IV por MMP-9 resulta no aumento da geração de fragmentos anti-angiogênicos que suprimem o crescimento tumoral do câncer de mama (BENDRIK et al., 2008); 3) O fragmento LG 4-5 extirpado, em vários tecidos, a partir da cadeia alfa 4 de laminina, inibe a adipogênese através da modulação do efeito de FGF - 2 (YAMASHITA et al., 2008); 4) Em situações de inflamação crônica ou aguda, as metaloproteases produzidas por neutrófilos ou macrófagos: elastase de neutrófilos (NE), a catepsina G, a proteinase - 3, e MMP - 2, -8, -9, e -12, geram fragmentos de laminina-332 com atividade quimiotática sobre neutrófilos (MYDEL et al., 2008); 5) MMP- 3, -12, -13, -14, -19 e -20, apresentam a capacidade de clivar a cadeia $\gamma 2$ de laminina, gerando o fragmento $\gamma 2x$, indutor de migração de células epiteliais (KOSHIKAWA et al., 2000).

Ainda que a laminina seja uma proteína amplamente estudada no contexto da morfogênese do sistema nervoso central por modular o crescimento de processos neuronais (MANTHORPE et al., 1983; ADLER et al., 1985; EDGAR; TIMPL; THORNEN, 1988), promover orientação axonal (COHEN et al., 1987; HAMMARBACK et al., 1988, MCLOON et al., 1988), induzir diferenciação (COHEN et al., 1986) e proliferação de células (DRAGO et al., 1991; FRADE et al., 1996), não existem estudos sobre os efeitos dos fragmentos proteolíticos gerados por metaloproteases sobre células do SNC.

Dessa forma, esse trabalho tem por objetivo avaliar a possibilidade da geração de fragmentos proteolíticos pelo tratamento dos polímeros de LMN-1 com meio condicionado por células de glioma C6.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. GLIOMAS

Os tumores cerebrais malignos estão entre os tipos mais temidos de câncer, não apenas pelo seu péssimo prognóstico, como também pelas repercussões diretas nas funções cognitivas e na qualidade de vida dos pacientes. No mundo, os cânceres de sistema nervoso central, representam 1,9% entre as neoplasias malignas existentes. No Brasil, dados atuais apontam uma incidência de 9.090 novos casos por ano, sendo estimada uma frequência de 5,01/1000 habitantes para o sexo masculino e 4,05/1000 habitantes para os indivíduos do sexo feminino. Durante as últimas décadas, na maioria dos países desenvolvidos, a incidência dos tumores de SNC aumentou significativamente. Além do aumento na expectativa e vida da população, que promove o aumento do surgimento de patologias associadas ao envelhecimento, a melhoria e a introdução de novas tecnologias de diagnóstico, a exemplo da tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear, permitem uma melhor quantificação dos casos (INCA, 2014).

Os gliomas formam o grupo mais comum de tumores encefálicos primários. De origem neuroepitelial, representam aproximadamente metade das neoplasias do SNC (MACHADO, 2004; GAN et al., 2012). A origem dos gliomas é tradicionalmente apontada como sendo das próprias células gliais (*p.e.* astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias). Entretanto, fontes mais recentes, sugerem uma origem a partir da diferenciação de células-tronco ou progenitoras neurais. Os tumores de origem astrocítica correspondem a 70-76% de todos os gliomas, (OMURO; DEANGELIS, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas humanos a partir de critérios histopatológicos que levam em consideração, além da celularidade e necrose, a atipia nuclear, a proliferação microvascular e a presença de figuras mitóticas (LOUIS et al., 2007). Essas características permitem graduar os astrocitomas de I a IV por ordem crescente de malignidade distribuindo-os em: astrocitoma pilocítico (grau I) que são tumores relativamente benignos, glioma astrocitário (grau II), astrocitoma anaplástico (grau III) e glioblastoma (GB) (grau IV), que representa 53,7% de todos os astrocitomas, sendo a forma mais maligna e o tipo mais comum entre os tumores primários cerebrais em adultos (LOUIS et al., 2007; PHILLIPS et al., 2007; PAVON et al., 2012).

O prognóstico pobre, o rápido crescimento e o potencial invasivo desses tumores encontram-se associados ao remodelamento da MEC no sítio de desenvolvimento tumoral. A

degradação de macromoléculas da MEC não apenas permite o crescimento da massa tumoral através da invasão do tecido circundante como também regula o crescimento e diferenciação das células de glioma. Esse evento envolve interações intra e extracelulares e secreção de MMPs principalmente dos tipo 2 e 9 (ASAHI, 2000; NAKADA et al., 2006).

Para estudo de aspectos moleculares associados aos gliomas são utilizadas células isoladas dos tumores, ou linhagens imortalizadas. As células C6 representam uma linhagem imortalizada de tumor cerebral de rato derivada de glioma. Essas células foram geradas utilizando injeções de N-nitrosometilureia como relatado inicialmente por Benda Philippe *et al.*, (1968). O estudo através de linhagem celular apresenta vantagens quando comparado ao estudo no tecido intacto por reduzir as variáveis associadas ao fenômeno biológico em análise e pela possibilidade do controle de condições ambientais como temperatura, manutenção do pH e saturação de O₂. Além disso, as culturas celulares podem ser propagadas, o que viabiliza em menor custo a reprodutibilidade dos resultados, necessária para a caracterização de um fenômeno em estudo.

2.2. METALOPROTEASES

As metaloproteases fazem parte de uma família que possui mais de 25 endopeptidases dependentes de zinco. São capazes de degradar macromoléculas presentes na MEC associadas ou não à superfície celular (WEISS, 2009). Em relação a sua estrutura geral, as MMPs possuem três domínios: o pró-peptídeo, o domínio catalítico e o domínio C-terminal hemopexina (KESSENBROCK et al., 2010).

As MMPs são inicialmente expressas em estado enzimaticamente inativo, devido a interação de um resíduo de cisteína do pró- domínio com o íon zinco do domínio catalítico. Estas enzimas tornam-se ativas quando ocorre remoção proteolítica do pró-domínio ou modificação química do resíduo de cisteína (PAGE-MCCAW et al, 2007). Podem ser divididas em duas subclasses: MMPs solúveis e MMPs ancoradas a membrana (WEISS, 2009).

Estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo remodelação tecidual e desenvolvimento embrionário, regulação de eventos inflamatórios e progressão do câncer (EGEBLAD, 2002). Já que estão relacionadas à proteólise, estas enzimas podem criar

espaços que oportunizam a migração celular, regulando a arquitetura tecidual. Além disso, podem gerar moléculas menores através da proteólise dos elementos originais da MEC

Por outro lado, a expressão dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC. Alterações na homeostasia entre as MMPs e os TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas à renovação não controlada da MEC, como artrite, câncer, doenças cardiovasculares (DCVs), nefrites, desordens neurológicas e fibroses (NAGASE, 1999).

Os TIMPs dos tipos 1 (TIMP-1) e 2 (TIMP-2) representam membros bem caracterizados dessa família de inibidores que apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de toda a família de MMPs (FOLGUERAS et al., 2004). Embora a TIMP-1 forme preferencialmente complexo com a MMP-9, o TIMP-2 atua sobre a MMP-2. A redução da atividade de ambos encontra-se associada ao aumento da atividade mitogênica em grande número de tipos celulares. Por outro lado, a superexpressão desses inibidores reduz o crescimento de células tumorais (GOMEZ, 1997). Finalmente, o TIMP-2 é considerado um inibidor de invasão e metástase de células tumorais *in vitro e in vivo* (ALBINE, 1991), e também da angiogênese associada a tumores (MURPHY, 1993).

A superexpressão de diversas MMPs parece estar fortemente relacionada à invasividade tumoral (WERB, 2010). Tentativas iniciais para identificar quais MMPs seriam responsáveis por intermediar a invasão de células neoplásicas revelaram que as enzimas secretadas, como as MMPs -2 e -9 eram as principais envolvidas neste processo (ROWE; WEISS, 2008). No entanto, este conceito tem se ampliado nos últimos anos, já que as MMPs -2 e -9 parecem não ser os únicos elementos que determinam a habilidade das células tumorais de degradar ou migrar através da lâmina basal (WEISS, 2008).

2.3. MEMBRANAS BASAIS

As membranas basais (MBs) constituem-se em uma especialização da matriz extracelular (MEC) que apresenta forma semelhante a uma folha e é composta principalmente pelas proteínas: laminina, colágeno do tipo IV, fibronectina e nidogen e pelo proteoglicano perlecan (TANZER, 2006). Nos animais, os órgãos e os tecidos apresentam uma arquitetura organizada contendo células aderentes a uma MB subjacente. As MB encontram-se, portanto na interface

entre células parenquimatosas e os tecidos de sustentação. Mais especificamente, são encontradas abaixo da superfície basal de todos os epitélios, em torno dos adipócitos, das células musculares, nos glomérulos renais e em torno dos vasos sanguíneos (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013). Nos vasos do Sistema Nervoso Central (SNC) é elemento importante na formação da barreira hematoencefálica (ROBERTS et al., 2012).

As MB desempenham um papel ativo na modulação de importantes fenômenos, como regeneração, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celular (MINER; YURCHENCO, 2004). Sua arquitetura molecular principal envolve duas redes poliméricas independentes de laminina e colágeno IV conectadas pela proteína nidogênio (AUMAILLEY et al., 1989). Na membrana basal há outros componentes que atuam estabilizando a malha, como os proteoglicanos e a proteína osteonectina BM-40 ou SPARC (*secreted protein acidican rich in cysteine*) (YURCHENCO; SCHITTNY, 1990).

Análises genéticas indicam que há uma hierarquia na formação da membrana basal durante o desenvolvimento, na qual o polímero de LMN-1 serve de suporte para o recrutamento dos outros componentes da malha. Estudos mostram ainda que a deficiência de membrana basal observada em corpos embriões que não produzem a cadeia $\alpha 1$ de laminina é restaurada através da adição de LMN-1 ao meio de cultura, tornando evidente a importância da LMN-1 neste fenômeno (ZHI-YONG et al., 2003).

Apesar de a membrana basal ser formada pela interação de vários elementos, a LMN-1 é o componente mais abundante das membranas basais de mamíferos (EKBLUM et al., 2003) e é o elemento que medeia a ligação destas estruturas às células (YURCHENCO et al., 1985; COLLOGNATO; YURCHENCO, 2000). É interessante notar que essa proteína pode ser a única integrante da membrana basal em alguns casos específicos, destacando seu valor fisiológico. Embora a membrana basal composta apenas por LMN tenha uma estrutura mais instável em comparação à composta por outras proteínas, a instabilidade é adequada para períodos de rápido rearranjo tecidual, como no desenvolvimento e em condições de regeneração (YURCHENCO et al., 1992).

A observação da membrana basal secretada por células de carcinoma embrionário pela técnica de microscopia eletrônica revelou uma estrutura composta por um padrão disposto regularmente com estruturas poligonais (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; MCKEE et al., 2007).

Estudos mostram que a deficiência em receptores específicos para LMN impede que a membrana basal seja formada da maneira correta; corpos embriões que não expressam a

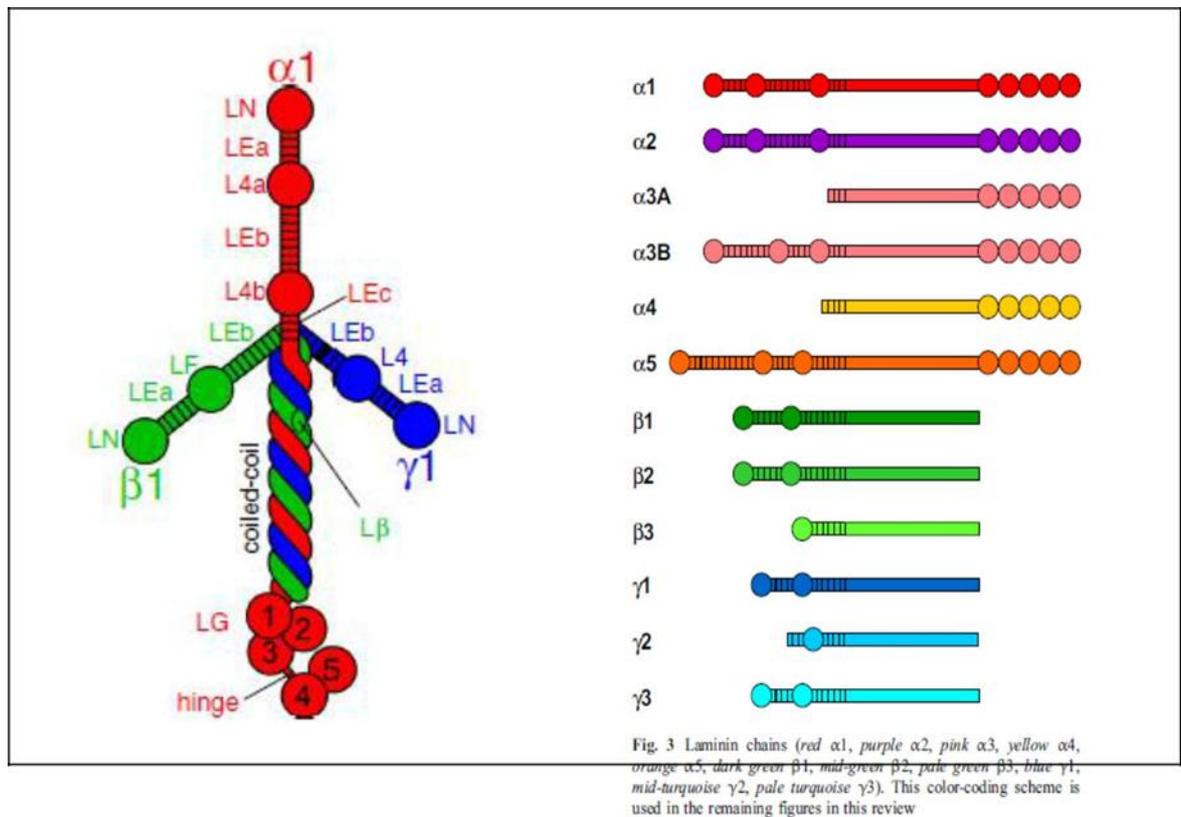
subunidade $\beta 1$ de integrina formam membranas basais estruturalmente desorganizadas e apresentam deficiências na secreção de componentes da matriz extracelular (AUMAILLEY et al., 2000). A presença do receptor dystroglican em embriões de ratos é fundamental para a formação adequada da membrana de Reichert, membrana basal extra-embrionária existente entre o trofoblasto e as células do endoderma parietal em embriões de mamíferos (WILLIAMSON et al., 1997). Além disso, estudos com animais *knockout* para o gene da subunidade $\alpha 3$ de integrina mostram que há malformação na membrana basal da epiderme observada ainda no período embrionário (DIPERSIO et al., 1997).

2.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA LAMININA

A primeira isoforma de LMN-1 foi identificada em 1979, tendo sido isolada a partir do processamento da matriz extracelular secretada por tumores Engelbreth-Holm-Swarm (TIMPL et al., 1979). Esta isoforma, possui aproximadamente 1000 kDa e é formada pela associação de três cadeias polipeptídicas (ENGEL et al., 1981), denominadas α , β e γ , formando, portanto, um heterotrímero (BURGESON et al., 1994). A cadeia α caracteriza-se por portar cinco domínios globulares na extremidade C-terminal (LG1-LG5), sendo por isso considerada a cadeia pesada, com aproximadamente 440 kDa, ao passo que as cadeias β e γ têm em torno de 220kDa cada (TIMPL et al., 1979).

A região C-terminal da cadeia α da LMN-111 associa-se covalentemente as cadeias β e γ , resultando em uma estrutura α -hélice *coiled-coil*de com 77nm de comprimento, que compreende o braço longo da molécula. Na região N-terminal, as três cadeias distintas encontram-se livres, formando três braços curtos independentes; o braço curto com 3 domínios globulares, pertencente à cadeia α e possui 48nm, e os outros dois possuem 34 nm cada (BRUCH et al., 1989). Portanto, a LMN-111 foi inicialmente descrita como uma proteína cruciforme, por apresentar um braço longo e três braços curtos, organizando-se em forma de cruz (ENGEL et al., 1981; YURCHENCO et al., 1985) (Figura 1). Atualmente, existem evidências de que, na organização adotada, *in vivo*, pelas moléculas, os braços curtos fiquem dispostos em um plano ortogonal ao braço longo (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; MCKEE et al., 2007). Assim, um guarda-chuva representaria melhor a disposição espacial da LMN-111.

Figura 1: Desenho esquemático da LMN-111, com seus domínios LN, L4, LE e LG e as diferenças estruturais entre os subtipos das cadeias α , β e γ .



Fonte: DURBEEJ, 2010.

A formação dos heterotrímeros ocorre no ambiente intracelular através de processos que envolvem a seleção, montagem e estabilização das cadeias. Inicialmente, no retículo endoplasmático, um dímero estável β/γ é formado, e, posteriormente, a subunidade α é integrada ao conjunto (COOPER et al., 1981). O trímero é então transportado para o complexo de golgi, onde um complexo processo de glicosilação tem início. De fato, após a detecção de LMN no ambiente intracelular, passam-se aproximadamente 40 minutos até que a mesma seja observada no meio de cultura (COOPER et al., 1981). A glicosilação da cadeia α ocorre mais intensamente em comparação às outras cadeias, e a estrutura de carboidratos presente na sua porção N-terminal parece ser determinante para o transporte de LMN do complexo de golgi para o meio extracelular (YURCHENCO et al., 1997).

Até a presente data, 5 cadeias α , 3 β e 3 γ foram identificadas (DURBEEJ, 2010). As possíveis combinações entre elas levariam a 45 isoformas distintas de proteína. No entanto, há apenas dezoito isoformas já identificadas, o que sugere uma restrição de combinações entre as cadeias polipeptídicas (HUNTER et al., 1992). De fato, o mecanismo de associação entre as

diferentes cadeias demonstrou-se altamente específico (HUNTER et al., 1992), sendo os fragmentos da porção *coiled-coil* do braço longo responsáveis pelo correto reconhecimento entre as cadeias em um processo regulado pela quantidade e distanciamento de cargas elétricas de grupamentos ionizáveis. (MACDONALD et al., 2010).

2.5. DOMÍNIOS PROTEICOS DA LAMININA E SUAS FUNÇÕES

Algumas regiões com sequências específicas de aminoácidos estão presentes nas três cadeias polipeptídicas que formam a LMN e são denominados domínios. A proteína apresenta 5 domínios globulares parcialmente homólogos (LG1-LG5) na região final do braço longo, mais especificamente na porção C-terminal das cadeias α . Estes domínios possuem cerca de 180 resíduos cada, e apresentam entre si até 45% de homologia; entre eles não há interrupções, com exceção de uma estrutura não globular que liga LG3 e LG4.

Na porção intermediária dos braços curtos das cadeias α e γ estão localizados os domínios L4. Na cadeia β , este domínio é denominado LF, “laminin four”, por apresentar diferenças em relação aos domínios L4. Na extremidade N- terminal de cada cadeia estão localizados os domínios LN, envolvidos na polimerização. Os domínios globulares dos braços curtos são intercalados por domínios não-globulares LE, que são sequências repetitivas, ricas em cisteína conhecidas como “*EGF-like domains*” (DURBEEJ, 2010) (Figura 1).

Os domínios LG C-terminais estão envolvidos principalmente no reconhecimento de receptores celulares. Os domínios LG4 e LG5 mostram uma grande afinidade por heparina (OTT et al., 1982). De modo semelhante, fragmentos de 50 kDa derivados da porção C-terminal da cadeia α contêm sítios de ligação a sulfatídeos (TARABOLETTI et al., 1990). Essas propriedades podem desempenhar papel fundamental na modulação da ligação de LMN aos seus receptores celulares, uma vez que permitem que grupamentos sulfato presentes na membrana das células sejam utilizados como co-receptores (TIMPL et al., 2000). Os domínios LG1-LG3 parecem conter as principais regiões de ligação a integrinas (DEUTZMANN et al., 1988) ao passo que LG4 está envolvido no reconhecimento do receptor α -dystroglican (ANDAC et al., 1999).

O domínio LE, ao qual era atribuída apenas a função estrutural de conectar os domínios globulares dos braços curtos, foi descrito como possuindo uma função própria. As sequências repetitivas dos domínios LE são conservadas entre espécies, e essa observação sugere que a

organização das sequências de LE possui importância funcional (BECK et al., 1990). De fato, sabe-se que fragmentos de LMN contendo apenas domínios LE são capazes de estimular a proliferação de fibroblastos e queratinócitos (PANAYOTOU et al., 1989).

O domínio LN, que está localizado na extremidade N-terminal dos braços curtos e está presente na maioria das cadeias polipeptídicas com exceção de $\alpha 3A$, $\alpha 4$ e $\gamma 2$, é a sequência mais conservada entre as espécies quando comparada a outras regiões da molécula (PANAYOTOU et al., 1989). Este domínio tem sido extensivamente estudado porque, além de ser reconhecido por receptores de membrana, é indispensável para a polimerização da proteína e conseqüentemente para a formação das membranas basais (YURCHENCO; SCHITTY, 1990; YURCHENCO; CHENG, 1993; MCKEE et al., 2007; DURBEEJ, 2010).

2.6. POLIMERIZAÇÃO DA LAMININA

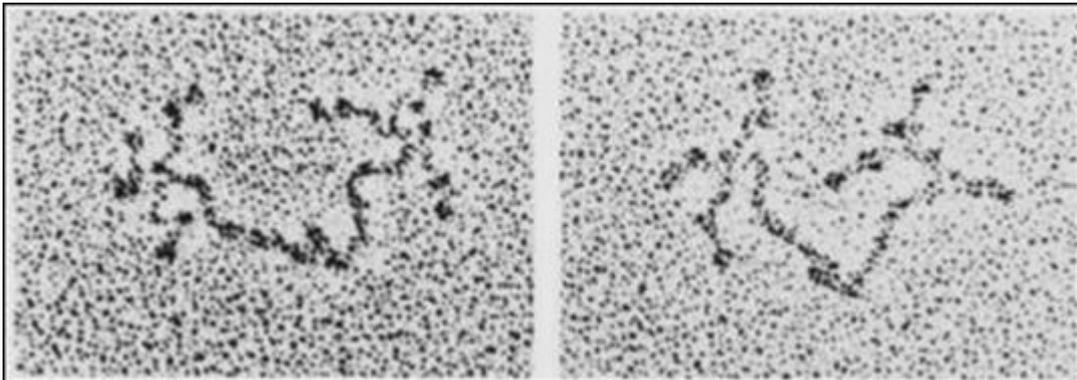
Moléculas de LMN, diferentemente de outras proteínas, se associam, na ausência de qualquer outro componente orgânico. A formação de polímeros tem sido observada *in vitro* após incubação da proteína na presença de cálcio com tampão neutro a 35°C, em concentrações a partir de 0,6 mg/ml ou 600nM. Este fenômeno acontece em duas fases, na primeira ocorre a formação de pequenos oligômeros e na segunda, que é dependente da modificação conformacional ocasionada pela ligação de íons cálcio à cadeia β (YURCHENCO; CHENG, 1993), ocorre a polimerização em larga escala. Este processo de polimerização é reversível e a proteína pode ser ciclicamente disposta sob a forma polimerizada e não polimerizada pela alternância de temperatura entre 35°C e 4°C (YURCHENCO et al., 1985).

Diversos trabalhos caracterizam os polímeros de LMN como sendo formados apenas pela interação entre os braços curtos da molécula, sendo o braço longo responsável pela interação com as células. Tal modelo de polimerização é compatível com o fato de que os principais sítios de ligação da LMN aos receptores celulares localizam-se no braço longo (YURCHENCO; CHENG, 1993; COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; YURCHENCO et al., 2004; MCKEE et al., 2007). No entanto, imagens realizadas pelo mesmo grupo de pesquisadores que propôs a polimerização através da ligação entre os braços curtos da LMN mostram, por microscopia eletrônica, a associação entre 2 moléculas formando dímeros através de interações entre os braços longos. Esse resultado contradiz o modelo proposto pelo

grupo (Figura 2) (YURCHENCO et al., 1985, YURCHENCO; SCHITTNY, 1990; YURCHENCO et al., 1992).

Foi observado em 1991 que a LMN forma polímeros em uma concentração bem mais baixa do que aquela descrita anteriormente (YURCHENCO et al., 1985) quando em presença de bicamadas lipídicas compostas apenas por sulfatídeos. No entanto, a polimerização da proteína não se apresenta tão evidente quando em presença de bicamadas lipídicas compostas por fosfolipídios de propriedades diferentes, tal como fosfatidilcolina, de carga neutra. Desta forma, propôs-se que a densidade de cargas negativas na superfície das células estaria modulando a associação entre as moléculas de LMN (KALB; ENGEL, 1991).

Figura 2 – Microscopia eletrônica, utilizando a técnica de sombreamento rotatório



Fonte: YURCHENCO et al. (1985).

Considerando que a densidade de cargas dispostas na membrana celular interfere na polimerização de LM, Freire e colaboradores sugeriram que o microambiente ácido gerado pelas cargas negativas dos sulfatídeos na superfície da bicamada lipídica poderia ser o fator desencadeante da polimerização proteica.

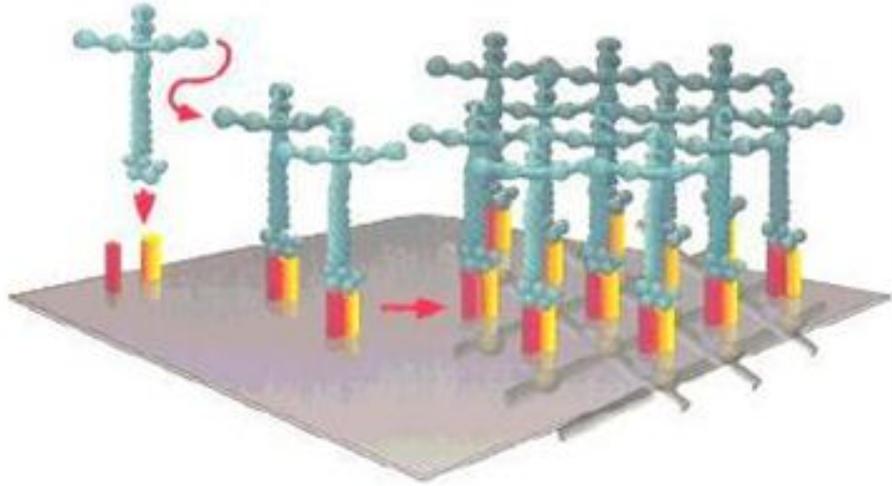
A demonstração de que a polimerização da LMN-111 ocorria após a sua diluição em tampão ácido, na ausência das bicamadas lipídicas carregadas, e em baixas concentrações sugeriu que as modificações conformacionais induzidas pelo pH ácido intensificariam as interações entre os braços curtos (FREIRE; COELHO-SAMPAIO, 2000). A análise da organização estrutural do polímero de LMN-111, mostrou que os polímeros obtidos por diluição da proteína em pH ácido difere estruturalmente dos obtidos por diluição da proteína em tampão neutro. A observação da arquitetura dos polímeros por microscopia eletrônica revelou que a estrutura dos polímeros formados em pH ácido é planar, organizada em

polígonos repetitivos de formato aproximadamente hexagonal. Os lados dos hexágonos correspondem aproximadamente ao tamanho dos braços curtos da molécula e a altura de cada camada tem em média $86 \pm 3\text{nm}$, correspondendo ao tamanho do braço longo da proteína. Portanto, a malha hexagonal seria formada exclusivamente pela interação entre os braços curtos, ficando o braço longo disposto em um plano ortogonal (BARROSO et al., 2008). Esses dados esclarecem o fato de que as isoformas de LMN que não possuem os braços curtos, como a LMN-332, não são capazes de desencadear a autopolimerização e não afetam a polimerização da LMN-111 quando incubadas em associação. (CHENG et al., 1997). Por outro lado, os polímeros formados em pH neutro são menos planares e apresentam uma superfície menos homogênea. (FREIRE et al., 2002)

A análise da distribuição de cargas sobre a superfície dos domínios terminais LG4 e LG5 revelou que, em pH neutro, essas regiões adquirem cargas negativas e positivas, ao passo que em pH ácido, adquirem uma superfície predominantemente positiva. A acidificação do meio, portanto, previne interações entre dois braços longos das moléculas de LMN. A organização tridimensional induzida pela acidificação do meio é compatível com aquela proposta para a polimerização *in vivo*, na qual a ligação do braço longo aos receptores celulares inviabilizaria sua participação na rede poligonal. Portanto, o pH ácido promove *in vitro* o um efeito similar ao que o receptor celular promoveria *in vivo*, mimetizando a organização das redes poliméricas que se formariam nos tecidos (BARROSO et al., 2008).

O modelo proposto para a polimerização *in vivo* da LMN considera a necessidade dos receptores celulares para a formação das redes poliméricas. Foi proposto que o mecanismo de polimerização ocorre em duas etapas. A primeira envolve a ligação da LMN aos seus ligantes de membrana, o que faz com que a concentração da proteína seja seletivamente aumentada na superfície celular. O aumento seletivo de concentração excede aquela necessária para que o processo de auto polimerização seja iniciado; a segunda etapa, então, corresponde à formação espontânea de polímeros junto à membrana das células (Figura 3). Esse fenômeno é acompanhado ainda pelo rearranjo do citoesqueleto, levando a modificações na morfologia celular e à reorganização dos receptores na membrana assim como a mudanças na distribuição de proteínas intracelulares. (COLOGNATO et al., 2000).

Figura 3: Esquema ilustrativo mostrando a participação do receptor no processo de polimerização da laminina



Fonte: COLOGNATO; YURCHENCO, p. 220, 2000.

2.7. POLÍMEROS DE LAMININA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Em 2002, surgiram as primeiras evidências de que a organização polimérica da LMN modulava sua sinalização celular (FREIRE et al., 2002). Essas diferenças foram atribuídas à disponibilidade diferencial de determinados sítios protéicos que são reconhecidos pelas células. Nos polímeros de LMN produzidos em condição neutra, por exemplo, existe maior envolvimento dos braços longos na formação das redes poliméricas de forma que estes ficam menos disponíveis para interagir com receptores na superfície celular. Além disso, determinadas regiões dos braços curtos podem ficar ocultas, uma vez que a matriz formada é irregular. Na condição ácida, por outro lado, as mesmas regiões dos braços curtos possivelmente estão expostas de maneira regular, de modo a serem prontamente reconhecidas pelos receptores celulares.

In vivo, foi observado que os polímeros de LMN obtidos em pH ácido e neutro provocam respostas diferentes quanto à regeneração do sistema nervoso central. Em um modelo de lesão de medula por compressão, os polímeros produzidos por diluição da proteína em meio ácido promoveu uma melhora funcional não evidenciada no tratamento da mesma lesão com o polímero neutro. Além disso, foi observada uma maior preservação do tecido, quando após

indução da lesão os animais recebiam o tratamento com a LMN polimerizada na condição ácida (MENEZES et al., 2010).

Durante a embriogênese do sistema nervoso central, a expressão de LMN é observada por toda a espessura do cérebro de ratos, estando relacionada a áreas de crescimento neurítico e maturação neuronal, sendo encontrada principalmente ao longo das rotas de migração de neuroblastos (HUNTER et al., 1992, LIESI et al., 1988) e nos tratos de fibras em crescimento (LETOURNEAU *et al.*, 1988; LIESI; SILVER, 1988; LUCKENBILL-EDDS, 1997). Após o desenvolvimento embrionário, a LMN é observada ao redor dos capilares, no plexo coroide, na membrana basal pial, a qual reveste todo o sistema nervoso central e ao longo da corrente migratória rostral (BELVINDRAH et al., 2007; MINER; YURCHENCO, 2004; MINER, 2008).

A organização dos polímeros de LMN no cérebro embrionário difere da organização no cérebro adulto. Uma evidência desta afirmação é o fato de que, em tecidos nervosos embrionários, diferentemente do tecido nervoso adulto, a LMN é facilmente extraída com tampões fisiológicos, o que sugere que a mesma está disposta em um arranjo solúvel e pouco estável (EDGAR, 1991). No parênquima cerebral embrionário, pode ser encontrada sob quatro arranjos tridimensionais: em depósitos pontuais pequenos ou grandes, associada às membranas dos neurônios ou em forma de lâmina. Essas formas não são produzidas simultaneamente e o padrão temporal em que são observadas sugere que possam ter funções diferentes no desenvolvimento (ZHOU, 1990).

Os depósitos pontuais de LMN, produzidos pelas células da glia, são observados no telencéfalo, hipocampo imaturo, mesencéfalo e diencefalo de ratos a partir do 14º dia do desenvolvimento embrionário, não sendo mais detectados poucos dias após o nascimento (ZHOU, 1990). Este período está relacionado a um intenso processo de migração neuronal e de crescimento axonal, inserindo os depósitos pontuais de LMN no panorama do estabelecimento de redes neurais e maturação do sistema nervoso central. De fato, as estruturas puntiformes estão localizadas exatamente no curso das fibras de glia radial (LIESI, 1985). A mesma correlação não pode ser feita com as outras estruturas tridimensionais de laminina que se mostram no desenvolvimento do sistema nervoso central, isto é, a em forma de lâmina, que está presente em todo o desenvolvimento e persiste durante a fase adulta e a associada às membranas dos neurônios, que só aparece nos estágios finais do período embrionário e que também prossegue na vida adulta (ZHOU, 1990).

Através da técnica de microscopia eletrônica, observou-se que o arranjo puntiforme de laminina está localizado em contatos entre neurônios e células da glia o que pode indicar uma sinalização entre essas células no sentido de promover a neuritogênese. Estudos indicam que a laminina puntiforme, produzida por astrócitos, pode ser um fator importante no crescimento axonal e na formação de fibras no sistema nervoso central de mamíferos. (LIESI; SILVER, 1988). Diversos estudos descrevem as interações neuronais com a laminina como importantes para o desenvolvimento adequado do cérebro (revisado em MINER; YURCHENCO, 2004) e mostram que a laminina secretada por astrócitos estimula a neuritogênese *in vitro* (COSTA et al., 2002; TARDY, 2002).

Os astrócitos são os maiores produtores de matriz extracelular do sistema nervoso central. Essas células, mesmo quando cultivadas *in vitro*, continuam a apresentar esta característica e estudos mostram que a matriz secretada por elas induz a neuritogênese em progenitores neurais (GARCIA-ABREU et al., 1995, FREIRE et al., 2004). As características da matriz de laminina secretada por astrócitos, no entanto, variam de acordo com a fase do desenvolvimento. Quando isolados a partir de córtices embrionários, os astrócitos depositam uma matriz que permanece associada à membrana da célula, ficando disposta em delicados arranjos geométricos; quando a partir de córtices de animais neonatos, a matriz de laminina é estabelecida em forma de fibras que se projetam a partir da membrana para o espaço extracelular (FREIRE et al., 2004). A atividade neuritogênica dessas matrizes também é distinta, de modo que neurônios plaqueados sobre astrócitos embrionários apresentam prolongamentos significativamente maiores do que aqueles plaqueados sobre astrócitos de animais já nascidos. No mesmo estudo, observou-se que essa diferença está relacionada à densidade de cargas negativas presentes na superfície da membrana plasmática dos astrócitos. No período embrionário, a presença de resíduos de ácido siálico, na membrana dessas células, é significativamente maior em comparação às células do período pós-natal. (FREIRE et al., 2004). Portanto, a organização estrutural das matrizes de laminina é determinante para o desenvolvimento correto do sistema nervoso central.

2.8. PROTEÓLISE DE POLÍMEROS DE LAMININA E RESPOSTAS CELULARES

A clivagem da matriz extracelular por proteólise desmascara locais crípticos e gera novos fragmentos com atividade biológica funcionalmente distinta daquelas apresentadas pelas moléculas intactas. O fragmento LG 4-5 da laminina tem sido mostrado ser extirpado a partir

da cadeia alfa 4 de laminina em vários tecidos. Tal fragmento inibe a adipogênese por modulação do efeito de FGF - 2 (YAMASHITA et al., 2008). Estudos recentes mostram que em situações de inflamação crônica ou aguda, as metaloproteases produzidas por neutrófilos ou macrófagos: elastase de neutrófilos (NE), a catepsinaG, a proteinase - 3, e MMP - 2, -8, -9, e -12, geram fragmentos de laminina-332 com atividade quimiotática sobre neutrófilos (MYDEL *et al.*, 2008). Outro estudo, desenvolvido por Udayakumar et al. (2008) sugere que a fragmentação proteolítica da cadeia $\beta 3$ de laminina-332 por MMP -14 promove a migração de células de carcinoma da próstata (UDAYAKUMAR et al., 2003). Por outro, o processamento da cadeia $\gamma 2$ por MMP-2, após o resíduo Ala-586, na junção do braço de curto ao domínio do filamento helicoidal, gera a remoção de todo o braço curto resultando em um fragmento de 80 kDa que permanece ligado as subunidades $\alpha 3$ e $\beta 3$ (GIANNELLI et al., 1997). Esta clivagem expõe um local críptico na cadeia $\alpha 3$ que é pró-migratório para as células epiteliais da mama (GIANNELLI et al., 1997). Além disso, a forma $\gamma 2 \times 80\text{kDa}$ tem sido associada com os tecidos submetidos a remodelação, ao passo que de comprimento completo $\gamma 2$ é encontradoa em tecidos quiescentes (GIANNELLI, et al., 1997, KOSHIKAWA et al., 2000). Outras MMPs, incluindo MMP- 3, -12, -13, -14, -19 e -20, podem clivar a cadeia $\gamma 2$, gerando o fragmento $\gamma 2 \times$ com capacidade de induzir a migração de células epiteliais (KOSHIKAWA et al., 2000). Embora a lamina seja uma proteína amplamente estudada no contexto da morfogênese do sistema nervoso central por modular o crescimento de neuritos (MANTHORPE et al., 1983; ADLER et al.,1985; EDGAR; TIMPL; THORNEN, 1988; CHAMAK; PROCHIANTZ, 1989), promover orientação axonal (COHEN *et al.*, 1987; MCLOON et al., 1988; HAMMARBACK et al., 1988), induzir diferenciação (COHEN et al., 1986) e a proliferação de células (DRAGO et al., 1991; FRADE et al., 1996), não existem estudos sobre os efeitos dos fragmentos proteolíticos gerados por metaloproteases sobre células do SNC.

3 HIPÓTESE

Considerando que células tumorais secretam MMPs com atividade proteolítica sobre elementos da MEC e que a laminina, sendo um componente da MEC, possui expressão aumentada em regiões de crescimento tumoral. Nossa hipótese foi de que a laminina poderia sofrer proteólise induzida por MMPs, gerando fragmentos proteicos com atividade biológica distinta daquela apresentada pela molécula intacta ou pela molécula em seu formato polimérico. Esses fragmentos poderiam desempenhar ação biológica sobre as células originais do tecido ou sobre as próprias células tumorais. Objetivamos inicialmente avaliar a ação proteolítica do meio condicionado por células C6 (MCC6). Subsequentemente, avaliamos se o MCC6 seria capaz de degradar matrizes de laminina adsorvidas em superfície ou solúveis. Finalmente avaliamos o padrão de fragmentos gerados pela proteólise.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação proteolítica do meio condicionado por células de glioma C6 sobre polímeros de laminina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar a presença de gelatinase em meio condicionado por células de gliomas C6 (MCC6);
- b) Determinar o peso molecular da gelatinase presentes no MCC6;
- c) Caracterizar a atividade proteolítica do MCC6 sobre polímeros de laminina através de imunomarcção;
- d) Investigar a produção de laminina por células C6;
- e) Comparar a organização de laminina na superfície de células C6 com a organização apresentada na superfície de células astrocíticas; e
- f) Determinar, por eletroforese, o peso molecular dos fragmentos de laminina obtidos por incubação dos polímeros com o MCC6;

5 MATERIAIS E MÉTODOS:

5.1. OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS DE GLIOMA C6

As células da linhagem C6 derivadas de glioma de rato (BENDA et al,1968) foram cultivadas em placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (TTP, trasadingen, Switzerland) em meio Eagle Dulbecco (DMEM), acrescido de nutriente F-12 (meio DMEM-F12, Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) e suplementado com: 10 % de SFB (Soro fetal Bovino), glicose (33 mM), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina (20UI/mL) e estreptomicina (20µg/mL) (GIBCO, EUA). O cultivo foi realizado em uma estufa biológica a 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico até que as células atingissem 80 % de confluência (± 2-3 dias). Após esse período, o tapete celular foi lavado com PBS 0,2% e mantido em meio DMEM-F12 isento de SFB, nas mesmas condições de cultivo, durante mais 24h. O meio condicionado foi coletado, centrifugado (2000 G) e armazenados em freezer -70 °C até o momento das análises.

5.2. OBTENÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR ASTRÓCITOS

As culturas primárias de células astrocíticas foram obtidas a partir de córtices cerebrais de ratos recém-nascidos (P0), de acordo com protocolo descrito por Gomes et al. (1999). Após decapitação, as estruturas corticais foram dissecadas e submetidas à remoção cuidadosa das meninges. Em seguida, os tecidos foram dissociados em células individuais em meio DMEM-F12 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) enriquecido com: glicose (33 mM), glutamina (2mM) e bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina (20UI/mL) e estreptomicina (20µg/mL) (GIBCO, EUA). As células foram semeadas no meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino a uma densidade de $2,0 \times 10^6$ células/cm² em placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (TTP, trasadingen, Switzerland). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, com trocas regulares de meio a cada 24 horas até a obtenção de aproximadamente 80% de sua confluência (10-14 dias). Após esse período, o tapete celular foi lavado com PBS 0,2% e reencubado com meio DMEM-F12 isento de SFB. As células foram mantidas nas mesmas condições de cultivo

durante mais 24h. O meio condicionado por células astrocíticas foi coletado, centrifugado (2.000 G) e armazenado em freezer -70 °C até o momento das análises.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE GELATINASE NO MCS

Para os ensaios zimográficos, os meios condicionados (MCs) por células C6 e por astrócitos foram concentrados através de um sistema de centrifugação a vácuo – *SpeedVac*

System™, *Thermo Scientific™*, até redução de aproximadamente ¼ do volume inicial. A concentração protéica final obtida foi de 35 µg de proteínas por 50 µL de amostra. Os concentrados foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da análise. As proteínas presentes nesses MCs foram então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8 %, sob condições não redutoras, contendo ou não 1 mg/mL de gelatina (Fisher Chemical Co., Fair Lawn, NJ). Após a corrida eletroforética, os géis que não continham gelatina foram imediatamente corados com *Coomassie Blue*. Os géis zimográficos, antes da coloração, foram lavados duas vezes, por 30 minutos, com Triton X – 100 (2,5 %) e incubados em tampão Tris/HCl 50 mM contendo 5 mM de CaCl₂ e 1 µM de ZnCl₂ (pH 8,4) durante 18h a 37°C, para renaturação das proteases. Nessas condições, as áreas de digestão de gelatina indicam as atividades da protease que são reveladas como antimanchas. As imagens foram obtidas por um sistema de captura de imagem fotodocumentador *ThermoScientific™*.

5.4 TRATAMENTO DE MATRIZES DE LAMININA COM MCS

Lamínulas de 13 mm de diâmetro previamente tratadas com hidróxido de sódio, ácido nítrico e etanol, respectivamente, para retirada de qualquer impureza foram autoclavadas. Em seguida, uma solução de laminina (LMN) de camundongo (Invitrogen) na concentração final de 50 µg/mL em tampão Acetato de sódio 20 mM, pH4, contendo 1 mM de CaCl₂ foi depositada sobre as lamínula. As lamínulas, acondicionadas sobre parafina em uma câmara úmida estéril, receberam 100 µL da solução de laminina, com os quais foram incubadas a 37°C durante 12 horas. Após este período, as lamínulas foram transferidas para a placa de 24 poços, lavadas três vezes com uma solução salina tamponada com fosfato PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e subsequentemente

incubadas com os meios condicionados por células C6 ou astrócito por 12 horas. Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS 0,2% e o material depositado sobre as mesmas foi fixado com paraformaldeído-sacarose 4% e submetido ao protocolo de imunomarcção para LMN.

5.5 TRATAMENTO DE POLÍMEROS DE LAMININA COM MCS

A laminina de camundongo (Invitrogen) foi diluída para uma concentração final de 50 µg/ml em tampão Acetato de sódio 20mM, pH4, contendo 1mM de CaCl₂. A solução foi submetida à centrifugação a 2000 G durante 10 minutos. Cerca de 90% do volume do sobrenadante foi descartado (900 µL). Os polímeros foram incubados com 400 µL de MCC6 ou por MCAs em temperatura ambiente, sobre agitação, por um período de 12h.

5.6 DIGESTÃO DA LAMININA E CARACTERIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE LAMININA POR ELETROFORESE

Os produtos da digestão dos polímeros de laminina pelo MCC6 e pelo MCAs foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. A corrida eletroforética foi induzida por uma corrente de 150 mV, sob condições redutoras. Após a migração das bandas, o gel foi corado com *Coomassie Blue* durante 2h e descorado com solução descorante contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. Foi utilizado o padrão de peso molecular *Prestained Standards, Borad Range* catalogo: # 161-0318 da *Bio-Rad* para inferência do peso molecular dos fragmentos.

5.7 VISUALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LAMININA POR CÉLULAS DE GLIOMA C6 E POR ASTRÓCITOS

As células de glioma C6 e as astrocíticas foram cultivadas em lamínulas de vidro, fixadas com paraformaldeído-sacarose 4% por 5 ou 15 minutos, lavadas com PBS 0,2% e posteriormente permeabilizadas ou não com solução de PBS-*tween* a 0,2% durante 10 minutos e submetidas ao protocolo para imunomarcção.

5.8. IMUNOMARCAÇÃO

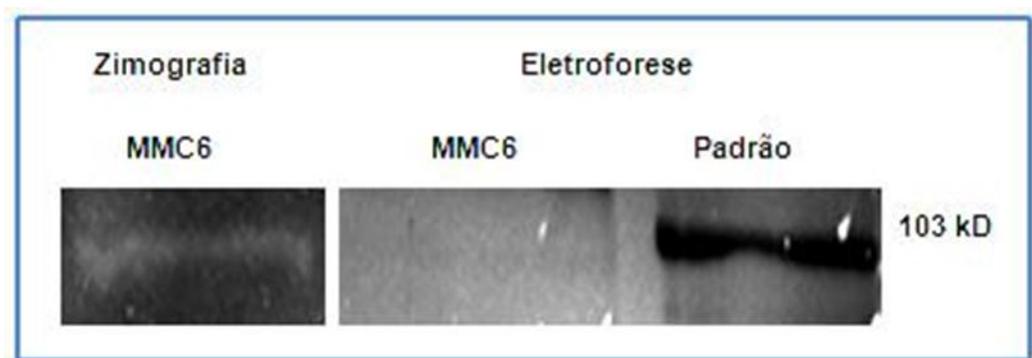
As matrizes de laminina depositadas sobre lamínulas de vidro tratadas ou não com meio condicionado por astrócitos ou células C6 foram fixadas por 15 minutos. As matrizes de laminina secretadas por células C6 foram fixadas por apenas 5 minutos. As lamínulas contendo neurônios plaqueadas ou células C6 foram fixadas por 15 minutos. Após a fixação as lamínulas foram lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 por três vezes, com intervalos de cinco minutos. Logo após, os neurônios ou as células C6 foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%) em PBS, por 15 minutos. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS, por três vezes, com intervalos de 5 minutos. Em seguida, os sítios de ligação não específicos foram bloqueados pela incubação com soro fetal bovino (SFB) 5% em PBS (PBS-SFB 5%), por 30 minutos e incubados com o anticorpo primário de escolha β Tubulina III (Santa Cruz *Biotechnology* ®) na diluição 1:200 ou Anti-laminina (*Invitrogen*TM) na diluição 1:50 em PBS-SFB 1%. As lamínulas foram incubadas em úmida por 12 horas a 4°C. Após o período de incubação, o material foi submetido à lavagem com PBS e procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário diluído em PBS-SFB 1%, por uma hora, a temperatura ambiente. Ao final do período de incubação, foram realizadas lavagens seguidas, incubação com DAPI (intercalante de DNA; cor azul) por 10 minutos, à temperatura ambiente, outras 3 lavagens consecutivas com PBS, uma lavagem com água destilada e finalmente foi realizada a montagem das lamínulas em n-propilgalato em glicerol 80% (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO). As lamínulas foram conservadas a -20°C, protegidas da luz. As células foram visualizadas com microscópio de fluorescência e fotografadas digitalmente, em microscopia ótica convencional. Pelo menos três campos aleatórios de cada poço foram representados.

6 RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINÁSICA

Inicialmente foi analisado se as células de glioma C6 seriam capazes de produzir proteases nas condições de cultivo utilizadas no estudo. A zimografia foi realizada com o intuito de verificar a ação gelatinásica dos meios condicionados. Os meios condicionados por células de glioma C6 ou por astrócitos cultivados a partir de córtices de ratos recém-nascidos foram concentrados e submetidos à corrida em gel zimográfico, enriquecido com gelatina. Após a coloração com *Comassi Blue*, foi observado a ação proteolítica do MCC6 sobre a gelatina (Fig. 5 coluna 1). Para determinação do peso molecular da gelatinase foi realizado em paralelo as corridas do gel Zimográfico e do gel eletroforético (Fig. 4 colunas 2 e 3). Esse procedimento, permitiu a identificação de uma banda com aproximadamente 100 KDa no meio condicionado por células de glioma C6. Não foi observada atividade proteolítica no meio condicionado por astrócitos nas condições experimentais testadas. Esteve et al. (1998) mostraram que as células C6 (MCC6), sem estímulo, e que células astrocíticas, sob estímulo inflamatório, produzem uma metaloprotease do tipo 9, MMP-9, com peso molecular equivalente ao detectado no MCC6 nas nossas condições experimentais.

Figura 4: Zimografia da atividade de gelatinase por MMP

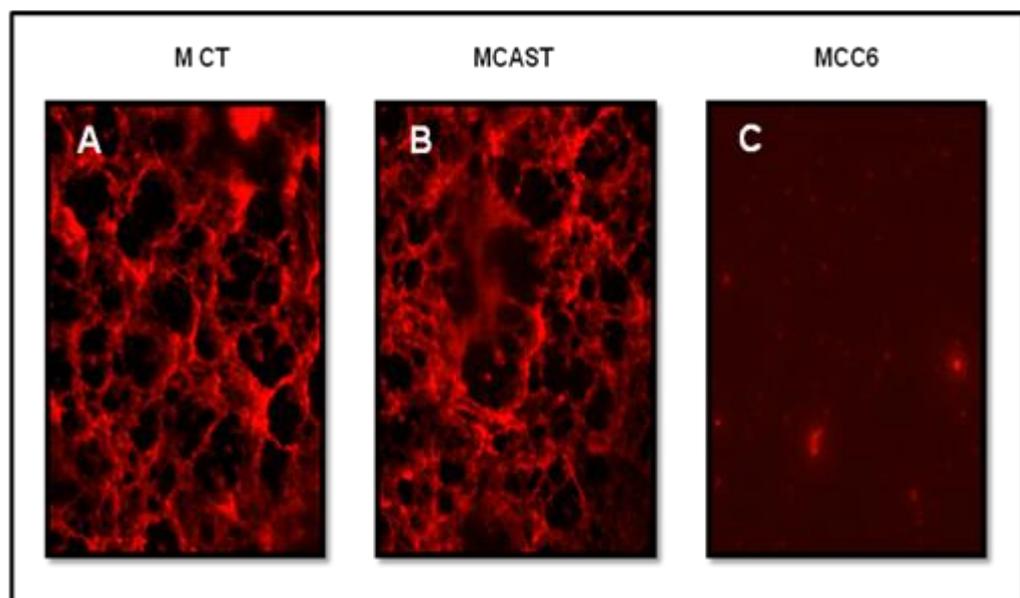


Fonte: Elaborado pela autora. Zimografia demonstrando atividade de gelatinásica do MCC6 e caracterização por eletroforese do peso molecular da gelatinas

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO MCC6 SOBRE POLÍMERO DE LAMININA.

Polímeros de laminina foram obtidos por diluição da proteína em tampão Acetato de sódio 20 mM, contendo 1mM de cloreto de cálcio para uma concentração de 50 μ g/mL. A solução obtida foi depositada sobre lamínulas de vidro. Nessas condições os polímeros de laminina adsorvem nas lamínulas (FREIRE et al., 2002). O procedimento para imunomarcação revelou a manutenção da integridade da organização das matrizes de laminina incubadas com o meio controle, não condicionado e com o meio condicionado por astrócitos (Fig. 5 A e B). Entretanto, organização polimérica foi intensamente afetada pela incubação com o meio condicionado por C6 (Fig.5 C). O dado sugere a possibilidade da ação proteolítica da gelatinase presente no MCC6 sobre os polímeros de laminina.

Figura 5: Imunocoloração para matrizes de laminina obtidos por diluição da proteína em tampão



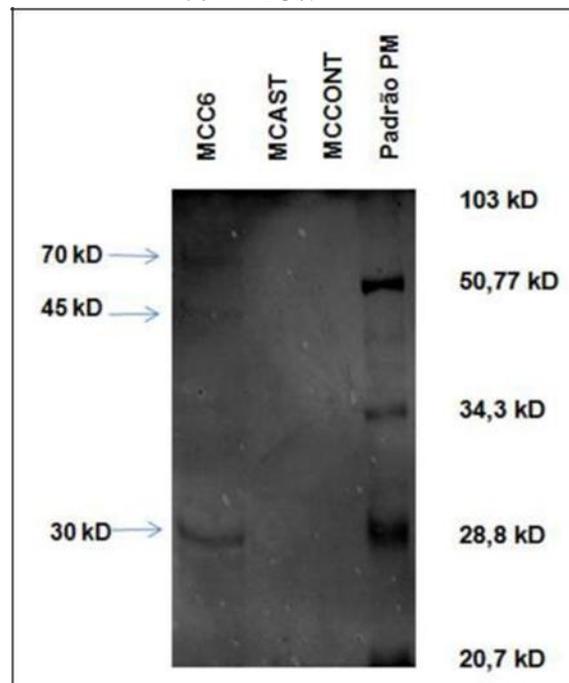
Fonte: Elaborado pela autora. Imunocoloração para matrizes de laminina obtidos por diluição da proteína em tampão ácido, lavadas e incubadas em meio controle (A), em meio condicionado por astrócitos (B) ou em meio condicionado por células C6 (C).

Para a melhor caracterização da ação proteolítica do MCC6, os polímeros de laminina, obtidos por diluição da proteína em TpAcNa, foram submetidos a centrifugação para retirada do meio indutor da polimerização. Subsequentemente os polímeros foram ressuspensos e

incubados com os seguintes meios: MCT, MCC6, MCAst. O material foi submetido à eletroforese em condições redutoras em um gel vertical homogêneo de poliacrilamida a 6%. Após coloração do gel com *Comassie blue*, o tamanho das bandas foi determinado por comparação com o padrão de peso molecular conhecido. Foram observadas três bandas com pesos moleculares de aproximadamente 30, 45, 70 kDa, sendo a de 30 kDa a mais abundante. Este resultado foi observado apenas para o material obtido através da incubação dos polímeros de laminina com o MCC6 (Figura 6).

As cadeias polipeptídicas que constituem a laminina apresentam alto peso molecular, não sendo observadas, mesmo em condições redutoras e em gel a 6%. Portanto, as bandas observadas na coluna referente ao material incubado com MCC6 mostram que ocorreu, nessa condição, a fragmentação proteolítica das cadeias de laminina através da incubação dos polímeros com o MCC6. Dessa forma, polímeros de laminina em presença de MCC6 contêm elementos proteicos distintos dos encontrados quando os mesmos polímeros são mantidos em presença de MCT e de MCAs.

Figura 6: Eletroforese de LMN solúvel polimerizada em tampão ácido após tratamento com MCs.

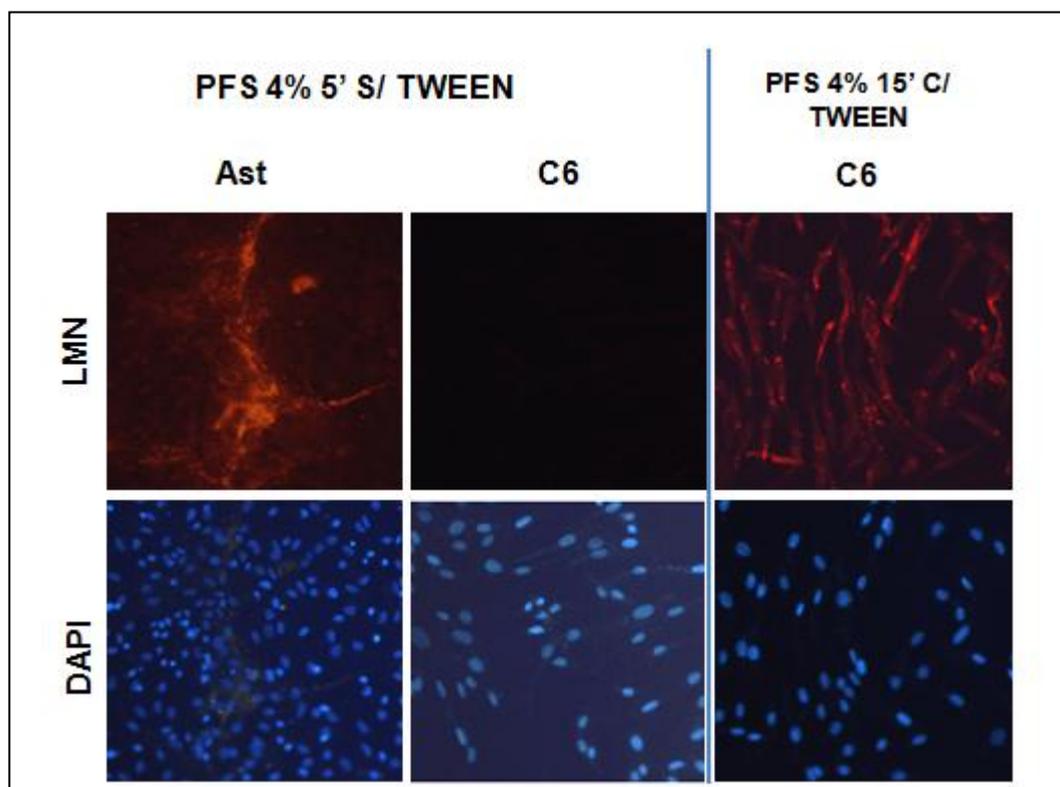


Fonte: Elaborado pela autora. Eletroforese (gel a 6%) de LMN solúvel polimerizada em tampão ácido e posteriormente tratadas com meio condicionado por células C6 (MC C6) ou meio condicionado por astrócitos (MC AST) ou meio de controle (MC CONT). Padrão de peso molecular (Padrão PM).

6.3. AVALIAÇÃO DA AÇÃO PROTEOLÍTICA DAS CÉLULAS C6 SOBRE LMN

Com o intuito de avaliar *in situ* a ação proteolítica do MCC6, foi realizada a marcação extra e intracelular de laminina em monocamadas de células C6. Lamínulas contendo células C6, em condição de confluência foram fixadas por tempo longo (15 min.) ou curto (5 min.), permeabilizadas ou não e submetidas ao protocolo de imunomarcação para LMN (Figura 7). A fixação por tempo curto, associada a não permeabilização, evita a penetração do anticorpo através da membrana celular e permite a visualização da laminina extracelular. Por outro lado, a fixação por tempo longo, associada à permeabilização, permite a marcação de laminina intracelular (FREIRE *et al.*, 2004). A figura 7 mostra que diferentemente da cultura de astrócitos, sobre células C6 não se observa o arranjo extracelular de laminina. No entanto, observa-se a marcação intracelular da proteína, indicando sua produção por esse tipo celular. Esses resultados sugerem que a superfície das células de glioma C6 apresenta condições para o estabelecimento da organização polimérica da laminina ou, mas provavelmente, que a laminina possa estar sofrendo a ação proteolítica gerada por proteases secretadas por essas células.

Figura 7: Imunocitoquímica para laminina intra e extracelular



Fonte: Elaborada pela autora através da microscopia de fluorescência. Imunocitoquímica para Laminina (Anti-laminina) Os núcleos encontram marcados em azul (DAPI).

7 DISCUSSÃO

O potencial invasivo das células tumorais está relacionado à sua capacidade de degradar os componentes da MEC, em mecanismos moleculares que envolvem a ação de metaloproteases de matriz - MMP (ESTEVE et al., 1998). Apesar da degradação da MEC constituir um evento essencial em muitos processos fisiológicos normais como durante o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos, sua intensificação é evidenciada em condições patológicas como inflamação e crescimento tumoral (ASAHI et al., 2000). A degradação de macromoléculas da MEC, não só permite que as células de glioma invadam os tecidos circundantes, como também pode provocar a perda da regulação do ciclo celular, crescimento e diferenciação das próprias células de glioma ou de outras células do tecido (ESTEVE et al., 1998). Até o momento, no contexto do SNC, existem poucas informações sobre as possíveis atividades biológicas que os fragmentos proteolíticos de elementos da MEC gerados em situações patológicas, por ação de MMP, possam exercer sobre as células em geral.

A laminina é encontrada em depósitos, em diferentes regiões do cérebro em desenvolvimento e nas MBs que existem em torno dos vasos sanguíneos, apresentando uma função relevante no controle da permeabilidade vascular e na morfogênese do SNC, sendo especificamente associada ao crescimento de neuritos, incluindo a formação de sinapses (LUCKENBILL-EDDS, 1997). Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a laminina forma estruturas poliméricas. *In vitro*, sua diluição em tampão ácido permite a formação de polímeros com aspectos estruturais análogos aos observados *in vivo* (FREIRE et al., 2012).

Nesse trabalho, investigamos a ação proteolítica de MCC6 sobre polímeros da proteína laminina. Utilizamos a zimografia para detectar a ação gelatinásia do meio condicionado por células de glioma C6, cultivadas com meio de cultura pobre de nutrientes e isento de estimulantes para MMP. Observamos que essas células são capazes de secretar a uma gelatinase com peso molecular de aproximadamente 100KDa. Esteves et al., (1998) relata que duas linhagens de células de gliomas distintos (C6 e A172), pré-tratadas com estimulantes de MMP, produzem *in vitro* dois tipos de metaloproteases a MMP-2 e a MMP-9. A MMP-9 possuem aproximadamente 100KDa. A metaloprotease de matriz (MMP) consiste em pelo menos 23 endopeptidases zinco-dependentes. Coletivamente, as MMPs são proteases extracelulares que são capazes de modificar quase todos os componentes da matriz extracelular (ESTEVE et al., 1998; ASAHI et al., 2001).

Outros trabalhos revelam o envolvimento de MMP-9 em patologias do SNC como na isquemia cerebral (ASAHI et al., 2001), acidente vascular cerebral (GU et al., 2005), esclerose múltipla (YONG et al., 1998) e doença de Alzheimer (HARTUNG; KIESEIER, 2000) além de estarem envolvidas em câncer desenvolvidos em outros tecidos, a exemplo de câncer de mama (YOUSEF et al., 2014; LAULAN; ST-PIERRE, 2015). Embora os nossos dados não sejam suficientes para a caracterização de metaloproteases no MCC6, detectamos uma gelatinase com peso molecular compatível com o da MMP-9.

Nesse trabalho observamos que os polímeros de laminina obtidos por diluição da proteína em pH ácido e depositados sobre lamínulas de vidro, mantêm sua organização estrutural quando incubados em MCT ou MCAst. Entretanto, não foi possível a visualização da organização polimérica dos polímeros depositados em vidro e incubados com MC por células C6. Além disso, quando os polímeros foram mantidos em solução e tratados com o MCC6 a corrida eletroforética do material obtido mostrou bandas de peso molecular inferior ao das cadeias de laminina, sugerindo um mecanismo de proteólise associado ao MCC6 e não detectado para o MCT ou para o MCAst. Estudos anteriores demonstram que a proteólise de componentes da matriz, embora possa produzir alterações em nível de permeabilidade vascular, é possível que a geração de fragmentos influencie em atividades biológicas de células do SNC (ROBERTS et al., 2012). Os dados em associação sugerem a possibilidade da ação de elementos sintetizados por células C6 com atividade sobre a laminina em sua forma polimerizada.

Os fragmentos proteolíticos decorrentes da ação do MCC6 sobre polímeros de laminina, gerou três fragmentos distintos com pesos moleculares de aproximadamente 30, 45 e 70 kD, sendo o fragmento com 30 kD o mais abundante (Figura 3). A literatura ilustra a obtenção de fragmentos de LMN por tratamento da proteína com proteases distintas (KOSHIKAWA et al., 2000; FREIRE et al., 2004; MYDEL et al., 2008; YAMASHITA et al., 2008;). Em especial, os dados desses trabalhos evidenciam a possibilidade da proteólise da laminina a partir da sua forma polimerizada, naturalmente encontrada *in vivo*. Portanto, embora os fragmentos tenham sido produzidos *in vitro*, foram considerados aspectos críticos evidenciados no crescimento tumoral.

Finalmente, a caracterização dos fragmentos gerados por proteômica e a investigação da possível ação desses fragmentos sobre células do SNC ou sobre as células de glioma pode consistir em achados relevantes para a compreensão das bases moleculares associados o eventos de crescimento tumoral e das respostas teciduais no contexto do SNC.

8 CONCLUSÃO

- Células C6, cultivadas nas condições experimentais utilizadas, secretam gelatinase;
- Meio condicionado por células C6, contendo gelatinase, é capaz de afetar a organização de matrizes de laminina obtidas por diluição da proteína em condição ácida e adsorvidas em lamínulas;
- Células C6 produzem, mas não apresentam laminina organizada sobre sua superfície como normalmente se sobre células astrocíticas; e em
- Meio condicionado por células C6, contendo gelatinase, é capaz de gerar fragmentos proteolíticos a partir de polímeros de laminina com 30, 45 e 70 kD.

REFERÊNCIAS

- ADLER, R.; JERDAN, J.; HEWITT, A. T. Responses of cultured neural retinal cells to substratum-bound laminin and other extracellular matrix molecules. **Developmental Biology**, v. 112, n. 1, p. 100-114, nov. 1985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3902534>>. Acesso em: 13 abr. 2015.
- ALBINI, A. et al. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. **J. Natl. Cancer Inst.**, [S. l.], v. 83, n. 11, p. 775-779, jun. 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1645772>>. Acesso em: 29 abr. 2015.
- ANDAC, Z.; SASAKI, T.; MANN, K.; BRANCACCIO, A.; DEUTZMANN, R.; TIMPL, R. Analysis of heparin, alpha-dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin alpha1 chain by site-directed mutagenesis. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 287, n. 2, p. 253-264, mar. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/10080889/>>. Acesso em: 04 abr. 2015.
- ASAHI, M.; ASAHI, K.; JUNG, J.C.; DEL ZOPPO, G. J.; FINI, M. E.; LOE, H. Role of matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [S. l.], v.20, n. 12, p.1681-1689, dez. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129784>>. Acesso em: 14 jul. 2015.
- AUMAILLEY, M.; PESCH, M.; TUNGGAL, L.; GAILL, F.; FÄSSLER, R. Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 113, pt 2, p. 259-268, jan. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10633077>>. Acesso em: 19 jun. 2015.
- BARROSO, M. M.; FREIRE, E.; LIMAVERDE, G. S.; ROCHA, G. M.; BATISTA, E. J.; WEISSMÜLLER, G.; ANDRADE, L. R.; COELHO-SAMPAIO T. Artificial laminin polymers assembled in acidic pH mimic basement membrane organization. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 17, p. 11714-11720, abr. 2008. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276595>>. Acesso em: 13 mar. 2015.
- BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **The FASEB Journal**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 148-160, fev. 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404817>>. Acesso em: 07 abr. 2015.
- BELVINDRAH, R. et al. Beta1 Integrins Control the Formation of Cell Chains in the Adult Rostral Migratory Stream. **Journal Of Neuroscience**, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 2704-2717, mar. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17344408>>. Acesso em: 09 jul. 2015.
- BENDA, Philippe; LIGHTBODY, James; SATO, Gordon; LEVINE, Lawrence; SWEET, William. Differentiated rat glia cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p. 370-371, jul. 1968. Disponível em<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4873531>>. Acesso: 24 set. 2015.

BENDRIK, C.; ROBERTSON, J.; GAULDIE, JACK.; DABROSIN, C.; Gene Transfer of Matrix Metalloproteinase-9 Induces Tumor Regression of Breast Cancer *In vivo*. **Cancer Research**, [S. l.], v. 68, n. 9, p. 3405-3412, maio, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451168>>. Acesso em: 03 jun. 2015.

BRUCH, M.; LANDWEHR, R.; ENGEL, J. Dissection of laminin by cathepsin G into its long-arm and short-arm structures and localization of regions involved in calcium dependent stabilization and self-association. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 185, n. 2, p. 271-279, nov. 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2511014>>. Acesso em: 07 ago. 2015.

BURGESSON, R. E.; CHIQUET, M.; DEUTZMANN, R.; EKBLUM, P.; ENGEL, J.; KLEINMAN, H.; MARTIN, G. R.; MENEGUZZI, G.; PAULSSON, M.; SANES, J. A new nomenclature for the laminins. **Matrix Biology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 209-211, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7921537>>. Acesso em: 07 jun. 2015.

CHAMAK, B.; PROCHIANTZ, A. Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. **Development**, [S.l.], v. 106, n. 3, p. 483 -491, jul. 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2598821>>. Acesso em: 01 mar. 2015.

CHENG, Y. S. et al. Self-assembly of laminin isoforms. **J. Biol. Chem.** [S. l.], v. 272, n. 50, p. 31525-31532, dez. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395489>>. Acesso em: 13 maio 2015.

COHEN, J.; BURNE, J. F.; WINTER, J.; BARLETT, P. Retinal ganglion cells lose response to laminin with maturation. **Nature**, [S. l.], v. 322, p. 465-467, jul. 1986. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v322/n6078/abs/322465a0.html>>. Acesso em: 17 abr. 2015.

COHEN, J.; BURNE, J. F.; MCKINLAY, C.; WINTER, J. The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 122, n. 2, p. 407-418, ago. 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2954871>>. Acesso em: 04 maio 2015.

COLOGNATO, Holly; YURCHENCO, Peter D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Developmental Dynamics**, [S. l.], v. 218, n.2, p. 213-234, jun. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842354>>. Acesso em: 06 jun. 2015.

COOPER, A. R.; KURKINEN, M.; TAYLOR, A.; HOGAN, B. L. Studies on the biosynthesis of laminin by murine parietal endoderm cells. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 119, n. 1, p. 189-197, set. 1981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7341241>>. Acesso em: 07 mar. 2015.

COSTA, S.; PLANCHENAULT, T.; CHARRIERE-BERTRAND, C.; MOUCHEL, Y.; FAGES, C.; JULIANO, S.; LEFRANÇOIS, T.; BARLOVATZ-MEIMON, G.; TARDY, M. Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability. **Glia**, [S. l.], v. 37, v. 2 p. 105-13, dez. 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.10015/pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2015.

DEUTZMANN, R. et al. Structural study of long arm fragments of laminin. Evidence for repetitive C-terminal sequences in the A-chain, not present in the B-chains. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 177, n. 1, p. 35-45, out. 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3181157>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

DIPERSIO, C. M.; HODIVALA-DILKE, K. M.; JAENISCH, R.; KREIDBERG, J. A.; HYNES, R.O. Alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. **The Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 137, n. 3, p. 729-742, maio 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151677>>. Acesso em: 07 jun. 2015.

DRAGO, John; NURCOMBE, Victor; BARTLETT, Perry F. Laminin through its long arm E8 fragment promotes the proliferation and differentiation of murine neuroepithelial cells in vitro. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 192, n. 1, p. 256 -265, jan. 1991. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1701728>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

DURBEEJ, M. Laminins. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 339, n.1, p. 259-268, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693542>>. Acesso em: 07 abr. 2015.

EDGAR, D.; TIMPL, R.; THORNEN, H. Structural requirement for the stimulation of neurite outgrowth by two variants of laminin and their inhibition by antibodies. **J. Cell Biol.** [S. l.], v. 106, n. 4, p. 1299 -1306, abr. 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2452171>>. Acesso em: 01 abr. 2015

EDGAR, D. The expression and distribution of laminin in the developing nervous system. **Journal of Cell Science, Supplemen**, Great Britain, v. 15, p. 9-12, 1991. Disponível em: <http://jcs.biologists.org/content/joces/1991/Supplement_15/9.full.pdf>. Acesso em: 13 ago 2015.

EGEBLAD, Mikala; WERB, Zena. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 161-174, mar. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990853>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

EKBLOM, Peter; LONAI, Peter; TALTS, Jan F. Expression and biological role of laminin-1. **Matrix Biology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 35-47, mar. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714040>>. Acesso em 01 set. 2015.

ENGEL, J.; ODERMATT, E.; ENGEL, A.; MADRI, J. A.; FURTHMAYR, H.; ROHDE, H.; TIMPL, R. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 150, n. 1 p. 97-120. jul. 1981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6795355>>. Acesso em: 07 set. 2015.

ESTEVE, P. O.; TREMBLAY, P.; HOUDE, M.; ST-PIERRE, Y.; MANDEVILLE, R. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, [S. l.], v. 1403, n.1, p. 85 - 96, maio 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622599>>. Acesso em 20 jun. 2014.

FOLGUERAS, A. R.; ALBERTO, M.; PENDÁS, L.; SÁNCHEZ, M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies.

The International Journal of Developmental Biology, [S. l.], v. 48, n. 5/6, p. 411-424, 2004. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349816>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

FRADE, J. M.; MARTÍNEZ-MORALES, J. R.; RODRÍGUEZ-TÉBAR, A. Laminin-1 selectively stimulates neuron generation from cultured retinal neuroepithelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 222, n. 1, p. 140 -149, jan. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8549656>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

FREIRE, E.; COELHO-SAMPAIO, T. Self-assembly of laminin induced by acidic pH. **J. Biol. Chem.**, [S. l.], v. 275, n. 2, p. 817-822, jan. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625612>>. Acesso em: 19 maio 2015.

FREIRE, E.; GOMES, F. C.; LINDEN, R.; NETO, V. M.; COELHO-SAMPAIO, T. Structure of laminin substrate modulates cellular signaling for neuritogenesis. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 115, pt. 24, p. 4867-4876, dez. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432074>>. Acesso em: 13 jul. 2015.

FREIRE, E.; GOMES, F. C.; JOTHA-MATTOS, T.; NETO, V. M.; SILVA FILHO, F. C.; COELHO-SAMPAIO, T. Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 117, p. 4067-76. abr. 2004. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/content/117/18/4067>>. Acesso em: 03 mar. 2015.

FREIRE, E. et al. Biocompatibility and Structural Stability of a Laminin Biopolymer. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 12, n. 1, p.67-74, 12 out. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994040>>. Acesso em: 14 mar. 2015.

GARCIA-ABREU, J.; MOURA NETO, V.; CARVALHO, S. L.; CAVALCANTE, L. A. Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. **J. Neurosci. Res.** [S.l.], v. 40, n. 4, p. 471-477, mar. 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7616607>>. Acesso em: 07 mar. 2015.

GIANNELLI, G.; FALK-MARZILLIER, J.; SCHIRALDI, O.; STETLER-STEVENSON, W. G.; QUARANTA, V. Induction of Cell Migration by Matrix Metalloprotease-2 Cleavage of Laminin-5. **Science**, [S. l.], v. 277, n. 5323, p. 225-228, jul. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211848>>. Acesso em: 08 mar. 2015.

GOMES, F. C. A.; GARCIA-ABREU, J.; GALOU, M.; PAULIN, D.; MOURA-NETO, V. Neurons-induced GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. **Glia**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 97-108, abr. 1999. Disponível em:<[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199904\)26:2%3C97::AID-GLIA1%3E3.0.CO;2-Z/abstract;jsessionid=71370337D78DDA4CC20AA737C7186A27.f02t01](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-1136(199904)26:2%3C97::AID-GLIA1%3E3.0.CO;2-Z/abstract;jsessionid=71370337D78DDA4CC20AA737C7186A27.f02t01)>. Acesso em: 02 mar. 2015.

GOMEZ, D. E; ALONSO, D. F.; YOSHII, H.; THORGEIRSSON, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **European Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 111-122, out. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352216>>. Acesso: 29 ago. 2015.

GU, Z. et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 25, n. 27, p. 6401-6408, jul. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000631>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

HAMMARBACK, James A.; MCCARTHY, James B. PALM, Sally L.; FURCHT, Leo T.; LETOURNEAU, Paul C. Growth cone guidance by substrate-bound laminin pathways is correlated with neuron-to-pathway adhesivity. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 126, n.1, p. 29-30, mar.1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3342934>>. Acesso em: 30 mar. 2015.

HARTUNG, H. P.; KIESEIER; B. C. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, [S. l.], v. 107, n. 2, p. 140–147, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572800002253> >. Acesso em: 20 maio 2015.

HOHENESTER, E.; YURCHENCO, P. D. Laminins in basement membrane assembly. **Cell Adhesion & Migration**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 56-63, jan. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076216>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

HUNTER, I.; SCHULTHESS, T., ENGEL, J. Laminin chain assembly by triple and double stranded coiled-coil structures. **Journal of Biological Chemistry**, U.S.A., v. 267, n. 9, p. 6006-6011, mar. 1992. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/267/9/6006.full.pdf> >. Acesso em: 13 jun. 2015.

INCA. **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124 p. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf>. Acesso em 15 de out. de 2015.

KALB, E.; ENGEL, J. Binding and calcium-induced aggregation of laminin onto lipid bilayers. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 266, n. 28, p. 19047-19052, out. 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1918022>>. Acesso em 24 abr. 2015.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, [S.l.], v. 141, n. 1, p. 52-67, abr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371345>>. Acesso em: 11 ago. 2015.

KOSHIKAWA, Naohiko; GIANNELLI, Gianluigi; CIRULLI, Vincenzo; MIYAZAKI, Kaoru; QUARANTA, Vito. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. **The Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 148, n. 3, p. 615-624, fev. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662785>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

LAULAN, Nathalie Bibens; ST-PIERRE, Yves. Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) and epidermal growth factor (EGF) inhibit metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in cancer cells. **Oncoscience**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 309-316, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4394136/>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

LETOURNEAU, P. C.; MADSEN, A.M.; PALM, S. L.; FURCHT, L. T. Immunoreactivity for laminin in the developing ventral longitudinal pathway of the brain. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 125, n. 1, p. 135-144, jan. 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3334714>>. Acesso em: 21 jul. 2015.

LIESI, Päivi. Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 4, n. 5, p.1163-1170, maio 1985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4006911>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

LIESI, Päivi.; SILVER, Jerry. Is astrocyte laminin involved in axon guidance in the mammalian CNS? **Developmental Biology**, [S. l.], v. 130, n. 2, p. 774-785, dez. 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160688903661>>. Acesso em 14 jul. 2015.

LOUIS, D. N.; HIROKO, O.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, [S. l.], v. 114, n. 2, p. 97-109, ago. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1929165/>>. Acesso em: 26 abr. 2015.

LUCKENBILL-EDDS, L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. **Brain research. Brain research reviews**, [S. l.] v. 23, n. 1/2, p. 1-27, fev. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063584>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

MACDONALD, P. R.; LUSTIG, A.; STEINMETZ, M. O.; KAMMERER, R. A. Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. **Journal of Structural Biology**, [S. l.], v. 170, n. 2, p. 398-405, maio 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156561>>. Acesso em: 14 set. 2015.

MACHADO, Camila Maria Longo. **Análise morfológica, citogenética e imunofenotípica de uma linhagem de glioblastoma humano: NG97**. 2004 72 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000316907>>. Acesso em: 15 abr. 2015

MANTHORPE, M.; ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E.; LONGO, F. M.; DAVIS, G. E.; VARON, S. Laminin promotes neurite regeneration from cultured peripheral and central neurons. **The Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 97, n. 6, p. 1882-1890, dez. 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6643580>>. Acesso em: 11 abr. 2015.

MCKEE, Karen K.; HARRISON, David; CAPIZZI, Stephanie; YURCHENCO, Peter D. Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 29, p. 21437-21447, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/282/29/21437.full>>. Acesso em: 17 set. 2015.

MCLOON, S. C.; MCLOON, L. K.; PALM, S. L.; AND FURCHT, L. T. Transient expression of laminin in the optic nerve of the developing rat. **Journal of Neuroscience**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 1981-1990, jun. 1988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3385486>>. Acesso em: 14 maio 2015.

MENEZES, K.; DE MENEZES, J. R.; NASCIMENTO, M. A.; SANTOS, R. de S.; COELHO-SAMPAIO, T. Polylaminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration

after spinal cord injury. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 4513-4522, nov. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643907>>. Acesso em: 13 set. 2015.

MINER, J.H., YURCHENCO, P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 20, p. 255-284, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473841>>. Acesso em: 06 ago. 2015.

MINER, J. H. Laminins and their roles in mammals. **Microsc. Res. Tech.**, [S. l.], v. 71, n. 5, p. 349-356, maio 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219670>>. Acesso em: 04 ago. 2015.

MIRAGLIA, M. Cruz et al. Brucella abortus induces TNF- α -dependent astroglial MMP-9 secretion through mitogen-activated protein kinases, **Journal of Neuroinflammation**, [S. l.], v. 10, n. 47, p. 1-14, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/47>>. Acesso em: 30 abr. 2015

MYDEL, PIOTR; SHIPLEY, J. M.; ADAIR-KIRK, T. L.; KELLEY, D. G.; BROEKELMANN, T. J.; MECHAM, R. P.; SENIOR, R. M. Neutrophil Elastase Cleaves Laminin-332 (Laminin-5) Generating Peptides That Are Chemotactic for Neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 15, p. 9513-9122, abr., 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178964>>. Acesso em: 02 abr. 2015.

MURPHY, Anne N.; UNSWORTH, Edward J.; STETLER-STEVENSON, William G. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 157, n. 2, p. 351-358, nov. 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693724>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

NAGASE, Hideaki; WOESSNER JR, J. Frederick. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 274, n. 31, p. 21491-21504, jul. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419448>>. Acesso em: 22 ago. 2015.

NAKADA, M.; NAKADA, S.; DEMUTH, T.; TRAN, N. L.; HOELZINGER, D. B.; BERENS, M. E. Molecular targets of gliomas invasion. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S.l.], v. 64, n. 4, p. 458 - 478, fev. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17260089>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

OMURO, Antonio; DEANGELIS, Lisa. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. **A Clinical Review**, [S. l.], v. 310, n.17, p. 1842-1850, nov. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24193082>>. Acesso em: 14 maio 2015.

OTT, U.; ODERMATT, E.; ENGEL, J.; FURTHMAYR, H.; TIMPL, R. Protease resistance and conformation of laminin. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 123, n. 1, p. 63-72, 1982. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7040076>>. Acesso em: 17 ago. 2015

PAGE-MCCAW, Andrea; EWALD, Andrew J.; WERB, Zena. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v.8, n.3, p. 221-223, mar. 2007. Disponível em. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318226>>. Acesso em: 21 out. 2015.

PANAYOTOU, G.; END, P.; AUMAILLEY, M.; TIMPL, R.; ENGEL, J. Domains of laminin with growth-factor activity. **Cell**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 93-101, jan. 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491959>>. Acesso em: 02 ago. 2015.

PAVON, L. F.; MARTI, L. C.; SIBOV, T. T.; MIYAKI, L. A. M.; MALHEIROS, S. M. F.; MAMANI, J. B.; BRANDT, R. A.; RIBAS, G. C.; PAGURA, J. R.; JOAQUIM, M. A. S.; JUNIOR, H. F.; GAMARRA, L. F. Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 197-202, abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052455>>. Acesso em: 14 jul. 2015

PHILLIPS, Heidi; FORREST, William; KHARBANDA, Samir; WU, Thomas. **Method for diagnosing, prognosing and treating glioma**. US20070141066 A1, 16 dez. 2005, 11 dez. 2006, 21 jun. 2007.

ROBERTS, J.; KAHLE, M. P.; BIX, G. J. Perlecan and the blood-brain barrier: beneficial proteolysis? **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 3, Ago. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936915>>. Acesso em: 05 abr. 2015.

ROWE, R. Grant; WEISS, Stephen J. Breaching the basement membrane: who, when and how? **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 18, n.11, p. 560-574, nov. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848450>>. Acesso em: 06 jun. 2015.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J. N.; REARDON, D. A. Diagnosis and tratament of high-grade astrocytoma. **Neurologic Clinics**, [S. l.], v. 25, n. 4, p.1111-1139, nov. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964028>>. Acesso em: 13 maio 2015.

TANZER, Marvin. L. Current concepts of extracellular matrix. **Journal of Orthopaedic Science**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 326–331, maio 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2778692/>>. Acesso em: 14 mar. 2015.

TARABOLETTI, G.; RAO, C. N.; KRUTZSCH, H. C.; LIOTTA, L. A.; ROBERTS, D. D. Sulfatide-binding domain of the laminin chain. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 265, n. 21, p. 12253-12258, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373692>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

TARDY, M. Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic outgrowth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 4, p. 683-690, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aabc/v74n4/v74n4a09.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2015.

TIMPL, R.; ROHDE, H.; ROBEY, P. G.; RENNARD, S. I.; FOIDART, J. M.; MARTIN G. R. Laminin – a glycoprotein from basement membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 254, n. 19, p. 9933-9937, out. 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/114518>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

UDAYAKUMAR, T. S. et al. Antisense MDM2 enhances E2F1-induced apoptosis and the combination sensitizes androgen dependent and independent prostate cancer cells to radiation. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 1742–1754, nov. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763100/>>. Acesso em: 09 mar. 2015.

WEISS, Nicolas; MILLER, Florence; CAZAUBON, Sylvie; COURAUD, Pierre-Olivier. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 1788, n. 4, p. 842-857, abr. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061857>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

WERB, Z.; KESSENBROCK, K.; PLAKS, V. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, [S. l.], v. 141, n. 1, p.52-67, abr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371345>>. Acesso em: 17 abr. 2015.

WILLIAMSON, R. A.; HENRY, M. D.; DANIELS, K. J.; HRSTKA, R. F.; LEE, J. C.; SUNADA, Y.; IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O.; CAMPBELL, K. P. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. **Hum. Human Molecular Genetics**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 831-841, jun.1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175728>>. Acesso 07 ago. 2015.

YAMASHITA, Hironobu; GOTO, Chie; TAJIMA, Rie; KOPARAL, Ayse Tansu; KOBORI, Masato; OHKI, Yuji; SHITARA, Kenya; NARITA, Ryo; TORIYAMA, Kazuhiro; TORII, Shuhei; NIIMI, Tomoaki; KITAGAWA, Yasuo; Cryptic fragment alpha4 LG4-5 derived from laminin alpha4 chain inhibits de novo adipogenesis by modulating the effect of fibroblast growth factor-2. **Development, Growth & Differentiation**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 97-107, fev. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18067585>>. Acesso em: 01 abr. 2015.

GAN, You; ZHI-YI, Sha; WEI, Yan; WEI, Zhang; YONG-ZHI, Wang; SHAO-WU, Li; LIN, Sang; ZI, Wang; GUI-LIN, Li; SHOU-WEI, Li; YI-JUN, Song; CHUN-SHENG, Kang; TAO, Jiang. Seizure characteristics and outcomes in 508 Chinese adult patients undergoing primary resection of low-grade gliomas: a clinicopathological study. **Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 230-241, fev. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2218734>>. Acesso em: 14 maio 2015.

YONG, V. W. et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nat Rev Neurosci.**, [S. l.] v. 2, n. 7, p. 502–511, jul. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433375>>. Acesso em: 14 maio 2015.

YOUSEF, E. M; TAHIR, M. R.; ST-PIERRE Y.; GABOURY, L. A. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast câncer. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 14, p. 1-12, ago. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151367>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

YURCHENCO, P. D.; TSILIBARY, E. C.; CHARONIS, A. S.; FURTHMAYR, H. Laminin polymerization in vitro – Evidence for a two-step assembly with domain specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 12, p. 7636-7644, jun. 1985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3997891>>. Acesso em 03 set. 2015.

YURCHENCO, P.D.; SCHITTNY, J. C. Molecular architecture of basement membranes. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 1577-1590, abr. 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2180767>>. Acesso em: 01 jul. 2015.

YURCHENCO, P.D.; CHENG, Y.S.; COLOGNATO, Holly. Laminin forms an independent network in basement membranes. **The Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 117, n. 5, p. 1119-1133, jun. 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577869>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

YURCHENCO, P. D.; CHENG, Y. S. Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. **The Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 268, n. 23, p. 17286-17299, ago. 1993. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8349613>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

YURCHENCO, P. D.; QUAN, Y.; COLOGNATO, Holly; MATHUS, T.; HARRISON, D.; YAMADA, Y.; O'REAR, J. J. The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 94, n. 19, p. 10189-10194, fev. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9294185>>. Acesso em: 07 abr. 2015.

YURCHENCO, P. D.; AMENTA, P. S.; PATTON, B. L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biology**, [S. l.], v. 22, n. 7, p. 521-538, jan. 2004. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996432>>. Acesso em: 13 abr. 2015.

YURCHENCO, Peter D.; PATTON, Bruce L. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. **Curr. Pharm. Des.**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 1277–1294, nov. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2978668/>>. Acesso em: 31 maio 2014.

ZHI-YONG, Huang et al. T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G2 phase arrest and requires p21(CIP1/WAF1) expression. **Mol. Cell. Biol.** [S. l.], v. 23, n. 2, p. 566-578, jan. 2003. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/23/2/566.full>>. Acesso em: 09 abr. 2015

ZHOU, F. C. Four patterns of laminin-immunoreactive structure in developing rat brain. **Brain research. Brain research reviews**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 191-201, set. 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253322>>. Acesso em: 24 abr. 2015.