

Análise de metaloproteases de matriz extracelular como indicador prognóstico nos gliomas malignos

Clovis Orlando da Fonseca¹, Marcos Masini², Gilberto Schwartzmann³,
Marcela Simão⁴, Débora Futuro⁵, Regina Caetano⁶, Cerli Rocha
Gattass⁷, Elen de Oliveira⁸, Thereza Quirico-Santos⁹

Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Faculdade de Medicina do Planalto Central, Brasília, DF, Brasil

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

Introdução: Metaloproteases de matriz extracelular (MMP) são enzimas proteolíticas sintetizadas na fase de fenótipo mais agressivo dos gliomas malignos, degradando proteínas da matriz extracelular, ocasionando ruptura da barreira hematoencefálica e contribuindo para a resposta neuroinflamatória, angiogênese e migração. Estudos mostram expressão de gelatinase A (MMP-2) proeminentemente nas células gliais tumorais, com pouca expressão na microvasculatura, enquanto expressão de gelatinase B (MMP-9) é proeminente na microvasculatura, com pouco sinal nas células tumorais. **Objetivo:** Neste estudo analisamos amostras de soro de 34 pacientes com gliomas malignos recidivos, antes e durante o tratamento com álcool perílico por via inalatória para determinar se a expressão de MMP poderia ser usada como indicador prognóstico. **Métodos:** A atividade gelatinase (MMP-2, MMP-9) nas amostras de soro foi determinada por zimografia e a atividade enzimática relativa foi determinada utilizando-se programa de análise densitométrica. Os valores foram correlacionados com exames de imagem e sobrevida dos pacientes. **Resultados:** Os resultados obtidos em nosso estudo evidenciaram que os pacientes com gliomas malignos apresentaram aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 quando comparados com pacientes saudáveis. Expressão aumentada de MMP-2 foi proporcional à progressão tumoral, sobrevida desfavorável e área de edema peritumoral. **Conclusão:** Esses resultados indicam proporcionalidade entre a expressão de MMP-2 e a malignidade dos gliomas, sugerindo seu emprego como indicador prognóstico para recorrência tumoral pós-operatória e sobrevida desfavorável dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE

Gliomas malignos. Quimioterapia. Metaloproteases de matriz extracelular. Álcool perílico.

ABSTRACT

Analysis of matrix metalloproteinase as prognostic indicator in malignant gliomas
Background: Matrix metalloproteinases are proteolytic enzymes secreted in phase of aggressive phenotype of malignant gliomas, degrading extracellular matrix proteins, causing blood brain barrier disruption, contributing for neuroinflammation response, angiogenesis and invasion. Studies found gelatinase A (MMP-2) expression most prominently in tumor cells, with very little expression seen in vasculature, while gelatinase B (MMP-9) expression was prominent in vascular structures with very little signal in tumor cells. **Objective:** We analyzed serum samples from 37 patients with relapsed malignant

1 Professor-associado de Neurocirurgia do Hospital Universitário Antonio Pedro da Universidade Federal Fluminense.

2 Professor adjunto do Serviço de Neurocirurgia da Faculdade de Medicina do Planalto Central.

3 Professor titular do Serviço de Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4 Graduanda da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

5 Professora adjunta da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

6 Professora adjunta do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense.

7 Professora adjunta do Laboratório de Imunologia Celular, Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

8 Graduanda de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense.

9 Professora titular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense.

gliomas before and in course of treatment with perillyl alcohol intranasal delivery to determine if MMP could be used as prognostic indicator. Methods: Gelatin activity (MMP-2, MMP-9) in serum samples was established by zymography and enzymatic activity was established applying densitometry analyze and values correlated with the patient's radiographic status and survival. Results: The results achieved in this study offer evidence that malignant gliomas patient demonstrate increase MMP-2 and MMP-9 expression when compare with health patients. Increase MMP-2 expression was proportional to tumor progression, poor survival and peritumoral zone of edema. Conclusion: These findings may indicate proportionality between MMP expression and malignance of gliomas, suggest application as a prognostic indicator for post-operative tumor recurrence and the patients' poor survival.

KEY WORDS

Malignant gliomas. Chemotherapy. Matrix metalloproteinase. Perillyl alcohol.

Introdução

Entre os novos aspectos da biologia molecular dos tumores humanos, as enzimas proteolíticas, que são produzidas pelas próprias células tumorais, pelas do estroma peritumoral ou pelo endotélio da vasculatura, têm adquirido uma importância especial. As proteases, em virtude de seu papel potencial na degradação dos elementos da matriz extracelular (MEC), facilitam a invasão tumoral e metástases, aspectos importantes na evolução do câncer¹³. Os gliomas malignos (GM) caracterizam-se por intensa invasividade e neovascularização, frustrando estratégias cirúrgicas, contribuindo para um curto intervalo de sobrevida. O mecanismo de migração dos GM sugere que as metaloproteases de matriz extracelular (MMP) desempenhem função crítica neste processo⁵. As MMP constituem uma família de endopeptidases, com atividade hidrolítica de amplo espectro para as proteínas extracelulares. As MMP estão amplamente distribuídas no organismo humano, onde desempenham uma série de funções fisiológicas, como, por exemplo, na cicatrização²¹, na reabsorção óssea², na involução mamária¹⁸ e em outras funções fisiológicas associadas a gravidez e parto¹⁰. Estudos demonstram que as MMP também estão implicadas em processos patológicos variados, como na artrite reumatóide⁸, na enfermidade periodontal¹⁵, na esclerose múltipla¹ e em certas alterações hematológicas⁶. Contudo, o papel das MMP na fisiopatologia tumoral, como determinantes do potencial metastático nas células neoplásicas, tem gerado maior interesse em investigação clínica, já que o processo de invasão tumoral inicia-se a partir da degradação de elementos da MEC e do estroma intersticial. As MMP ampliam o processo de invasão tumoral, não só por meio da degradação das proteínas da MEC, como também pela ativação de cascatas de transdução de sinal, que promovem motilidade, e pela solubilização de fatores de crescimento ligados à MEC¹⁴. Um aspecto relevante da dinâmica das MMP na fisiopatologia tumoral é que

sua expressão pode ocorrer tanto em células neoplásicas quanto estromais e endoteliais peritumorais⁷. Estas últimas, provavelmente, recebem sinais bioquímicos originados do tumor, como fatores de crescimento e citocinas¹⁹.

Neste estudo estabelecemos parâmetros de monitoramento e análise de expressão da atividade das MMP como facilitadores da tumorigênese, crescimento e sobrevivência tumoral, influenciando a morbidade e mortalidade de pacientes com gliomas malignos recidivos. Os resultados obtidos foram consoantes com a correlação entre expressão de MMP e alto grau de agressividade e malignidade tumoral.

Material e métodos

Pacientes

Os pacientes com diagnóstico comprovado de gliomas malignos recidivantes foram avaliados quanto aos critérios de elegibilidade para a entrada no estudo: "Estudo fase II do monoterpene álcool perillylico em pacientes com glioblastoma multiforme recidivante" (Projeto aprovado pelo CONEP, registro 9681, nº 25000.009267/2004-25, 12 de julho, 2004). Antes da solicitação dos exames necessários, os candidatos concordaram em participar do estudo mediante a assinatura de um consentimento livre e informado, lido pelo investigador ao paciente ou seu familiar responsável. O sangue de cada paciente foi coletado antes e trimestralmente após o início do tratamento com álcool perillylico (AP). Após coleta, o tubo contendo o sangue foi mantido em repouso por 30 minutos, para posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. O plasma e o soro foram guardados a -80°C para posterior análise.

Zimografia

A atividade gelatinase (MMP-9, MMP-2) nas amostras de soro foi determinada por zimografia, por eletroforese SDS-PAGE gel 8% de poliacrilamida e 0,1% de gelatina e posterior renaturação pela incubação com 2,5% de Triton-X100, por 30 minutos. O gel foi incubado durante 18 horas a 37°C, em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo 10 mM de CaCl₂ e 0,05% Brij (Sigma) e corados com Coomassie azul brilhante. Também foram incluídos no gel padrão de peso molecular e de MMP-2 e MMP-9 (Bio-Rad, USA). Atividade enzimática relativa foi determinada utilizando-se programa de análise densitométrica.

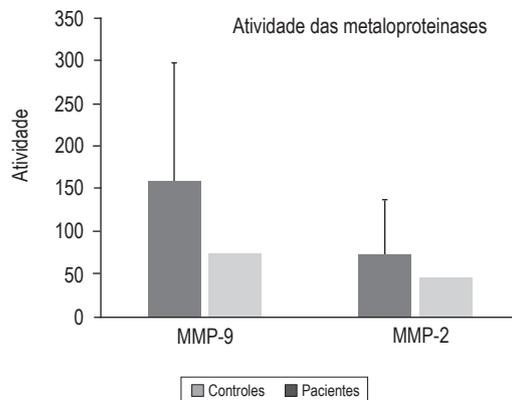


Figura 1 – Aumento da expressão das MMPs nos pacientes com gliomas malignos quando comparados com os pacientes saudáveis.

Resultados

Análise das MMP em plasma de pacientes com gliomas malignos tratados com AP

Estudamos a expressão e atividade metaloprotease por exame de zimografia antes e durante o tratamento dos pacientes. Os resultados obtidos em nosso estudo evidenciam que os pacientes com gliomas malignos apresentam aumento da expressão das MMP quando comparados com indivíduos saudáveis (Figura 1). Os pacientes que responderam ao tratamento com AP apresentaram redução da atividade da MMP-2 e MMP-9. Os que sofreram progressão tumoral, aumento do volume do tumor e/ou área de edema visualizado em exames de imagem tiveram aumento da atividade da MMP-2 (Figura 2).

Caso ilustrativo

Paciente do sexo feminino, de 69 anos, incluída no protocolo Estudo Clínico Fase II do Álcool Perílico em Pacientes com Gliomas Malignos Recidivados (CONEP 9.681 nº 25000.009267/2004-25, aprovado em julho de 2004). O álcool perílico vem sendo administrado em concentração de 0,3%, por via inalatória, quatro vezes ao dia, desde 20 de maio de 2005. A análise da expressão das MMP foi efetuada em correlação com a avaliação do volume tumoral. A avaliação do volume tumoral feita com exames de ressonância magnética mostrou redução significativa do tumor entre maio de 2005 e abril de 2006. Concomitantemente, a análise de MMP evidenciou aumento de MMP-2 em abril de 2006

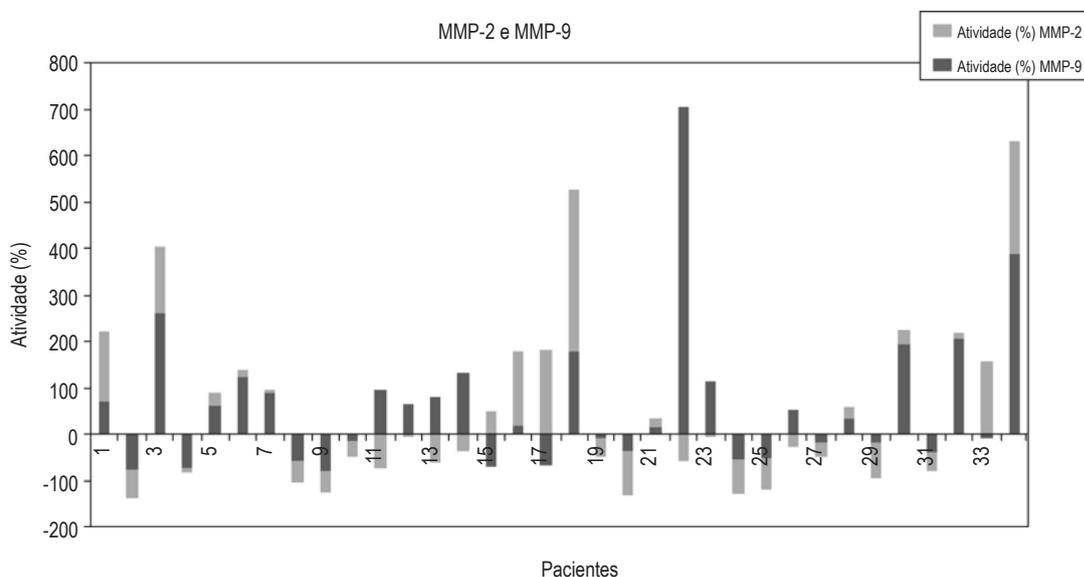


Figura 2 – Análise das MMPs em plasma de pacientes com gliomas malignos tratados com AP. Pacientes que apresentaram aumento da expressão das MMPs tiveram sobrevida menor. Pacientes que apresentaram diminuição da expressão de MMPs tiveram sobrevida maior.

(Figura 3), prognosticando atividade tumoral, tendo ocorrido recidiva tumoral em novembro de 2006, que exigiu nova ablação cirúrgica (Figura 4).

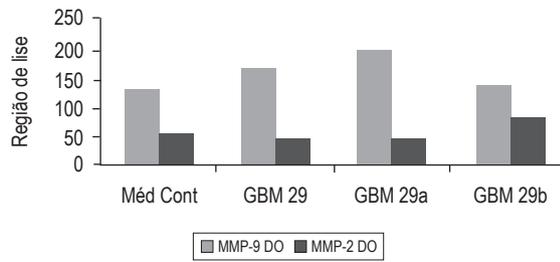


Figura 3 – Análise de expressão de MMPs.
Méd Cont: médio controle. GBM 29 exame em maio de 2005; GBM 29a exame em outubro de 2005; GBM 29b exame em abril de 2006. Evidencia-se aumento de MMP-2 em abril de 2006 prognosticando aumento de atividade tumoral, que de fato ocorreu em novembro de 2006.

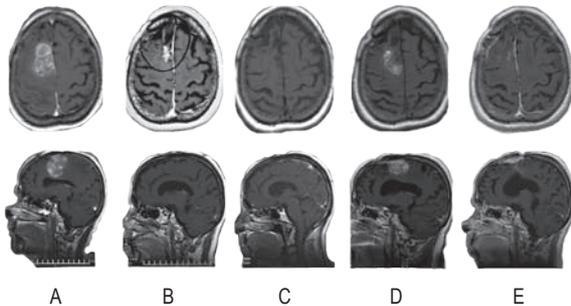


Figura 4 – A: RM em maio de 2005; B: em outubro de 2005; C: em abril de 2006; D: em novembro de 2006. Evidencia-se recidiva tumoral em novembro de 2006; E: RNM em março de 2008.

Discussão

Neste estudo estabelecemos parâmetros de monitoramento e análise de expressão da atividade das MMP como facilitadores da tumorigênese, crescimento e sobrevivência tumoral, influenciando a morbidade e a mortalidade em um espectro de 34 pacientes com gliomas malignos recidivos. Os resultados da atividade gelatinase-A (MMP-2) e gelatinase-B (MMP-9) nas amostras de soro foram determinados por zimografia e também mostraram que existe associação entre a expressão das MMP e os subtipos clínicos de GBM primário e secundário.

Pesquisas¹⁷ mostraram aumento do nível da atividade das gelatinases em tecidos de gliomas quando comparados com tecido cerebral normal. Ambas, gelatinase-A e gelatinase-B, são expressas nas células tumorais e na vasculatura. A expressão da gelatinase-A é mais proeminente nas células tumorais. A gelatinase-B mantém expressão pronunciada nos vasos sanguíneos

do microambiente tumoral. Esses dados sugerem que ambas MMP sejam produzidas nas células gliais e, de modo potencialmente importante, em gliomas¹⁷. Em nosso estudo observamos, entre os pacientes com gliomas malignos recidivos que apresentaram redução do volume tumoral e aumento da sobrevida, a constância do edema cerebral peritumoral, apesar do uso continuado de corticosteroide. Estudos mostram que as células gliais expressam MMP em resposta à lesão celular, degradando os componentes da lâmina basal e acarretando ruptura da barreira hematoencefálica, contribuindo para a resposta neuroinflamatória em muitas doenças neurológicas¹⁶, o que proporciona ocorrência de edema vasogênico. A atividade das MMP é regulada tanto em nível de transcrição pelas citocinas e fatores de crescimento quanto em nível pós-transcrição pela secreção de enzimas latentes (pré-pró-MMP) e ativação de zimogênios (pró-MMP) por integrinas e proteases tanto presentes no meio extracelular quanto associadas à membrana celular, como MT-MMP. Existe um equilíbrio preciso entre a produção endógena de inibidores teciduais – TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) – e a produção de MMP no microambiente, determinando a remodelagem fisiológica ou a destruição patológica do tecido⁴. Na forma latente, pró-MMP-2 é ativada pela interação com MT-MMP (*membrane-type metalloproteinases*), formando um complexo com o inibidor tissular da MMP-2, permitindo ativação da MMP e conseqüente transmigração celular pela barreira hematoencefálica alterada⁹.

As expressões de MMP-2 e MMP-9 são avaliadas pela zimografia, um método enzimático que detecta a atividade dessas proteínas¹². Nosso estudo determinou, usando esse método, a atividade de MMP antes e durante o tratamento com AP por via inalatória. Os resultados mostraram que, nos pacientes que apresentaram redução do volume tumoral com o tratamento, houve inibição da expressão da atividade de MMP-2 e MMP-9. Nos pacientes não tratados e nos que não responderam ao tratamento com o AP, existe aumento da atividade dessas proteínas. Alguns autores²⁰ concluíram que o aumento da expressão da atividade de MMP está associado com curto período de sobrevida em pacientes com GBM primário e sugerem que a expressão de EGFRvIII possa promover ativação de MMP-9, possivelmente pela via MAPK/ERK. Estudos³ anteriores do nosso grupo mostraram que o AP pode atuar inibindo a ERK. Os resultados obtidos no presente trabalho também evidenciaram a associação entre a expressão das MMP-9 e o subtipo de GBM primário, clinicamente diagnosticado. Esses resultados permitem aventar a hipótese de que pacientes com GBM primários podem se beneficiar com terapia anti-MMP.

Autores¹⁷ propõem que MMP-2 tenham atividade na invasividade das células de glioma, enquanto MMP-9 na angiogênese e neovascularização tumoral. No caso ilustrativo apresentado, a análise de MMP evidenciou aumento da expressão de MMP-2 quando o exame de imagem apresentava regressão tumoral. Esse resultado, prognosticando futura recidiva tumoral, é consoante com estudos¹¹ que preconizam que tais enzimas são expressas nas células gliais transformadas, que atuam na clivagem da matriz extracelular durante a invasividade tumoral.

Conclusão

As observações obtidas neste estudo sugerem que o aumento da expressão de MMP poderia ser marcador biológico independente, prognosticando recorrência em pós-operatório de pacientes com gliomas malignos. A questão da invasividade dos gliomas e da expressão das enzimas que remodelam a matriz extracelular é, sem dúvida, promissora também em termos terapêuticos.

Agradecimentos

CNPq, Faperj, Finep/NTQN, Fundação Euclides da Cunha/UFF e AMIL Assistência Médica Internacional.

Referências

1. CHANDLER S, MILLER KM, CLEMENTS JM, LURY J, CORKILL D, ANTHONY DCC et al.: Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunology* 72:155-61, 1997.
2. DELAISSÉ JM, VAES G: Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. *Biology and Physiology of the Osteoclast*. Boca Raton: CRC Press 1992, pp. 289-314.
3. FISCHER JSG, SILVA MMS, CARVALHO PC, PASCHOAL MP, GATTASS CR, AND CARVALHO MGC: Effects of perillyl alcohol and heat shock treatment in gene expression of human lung adenocarcinoma cell line A549. *J Exp Ther Oncol* 5:301-7, 2006.
4. GALBOIZ Y, SHAPIRO S, LAHAT N, MILLER A: Modulation of monocytes matrix metalloproteinase-2, MT1-MMP and TIMP-2 by interferon-gamma and -beta: implications to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 131:191-200. 2002.
5. GIANNELLI G, FALK-MARZILLIER J, SCHIRALDI O, STETLER-STEVENSON G, QUATANTA V: Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277:225-8, 1997.
6. GUEDEZ L, LIM MS, STETLER-STEVENSON WG: The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Critical Rev Oncog* 7:205-25, 1996.
7. HÄHNEL E, HARVEY JM, JOYCE R, ROBBINS PD, STERRET GF, HÄHNEL R: Stromelysin-3 expression in breast cancer biopsies: clinic-pathological correlations. *Int J Cancer* 55: 771-4, 1993.
8. HARRIS ED Jr: Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 322:1277-89, 1990.
9. HARTUNG HP, KIESEIER BC: The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 107:140-7, 2000.
10. JEFFREY JJ: Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin Perinatol* 15:118-26, 1991.
11. KIM SH, CHOI HY, LEE J, SON DS, LEE HS, SONG IS, LIM YS, HONG YS, KIM J, CHOI YS: Elevated activities of MMP-2 in the non-tumorous lung tissues of curatively resected stage I NSCLC patients are associated with tumor recurrence and a poor survival. *J Surg Oncol* 95:337-46, 2007.
12. LIOTTALA, STETLER-STEVENSON WG: Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1:99-106. 1990
13. LIOTTA LA, STEEG PS, STETLER-STEVENSON WG: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64:327-36, 1991.
14. MCCAWLEY LJ, MATRISIAN LM: Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6:149-56, 2000.
15. PAGE RC: The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 26: 230-42, 1991.
16. ROSENBERG GA: Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39:279-91, 2002.
17. RAITHATHASA, MUZIK H, REWCASTLE NB, JOHNSTON RN, EDWARDS DR, FORSYTH PA: Localization of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. *Neuro-oncology*. *Neuro-oncol* 2:145-50, 2000.
18. TALHOUK RS, BISSELL MJ, WERB Z: Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 118:1272-82, 1992.
19. URÍA JA, FERRANDO A, VELASCO G, FREIJE JMP, LÓPEZ-OTÍN C: Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *Cancer Res* 54:2091-4, 1994.
20. WANG M, WANG T, LIU S, YOSHIDA D, TERAMOTO A: The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol* 20:65-72. 2003.
21. WOLF C, CHENERD MP, DURAND DE GROSSOUVRE P, BELLOCQ JP, CHAMBON P, BASSET P: Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* 99:870-2, 1992.

Original recebido em maio de 2007

Aceito para publicação em fevereiro de 2008

Endereço para correspondência

Clovis Orlando da Fonseca

Departamento de Cirurgia Geral e Especializada, Hospital
Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense,
24030-210 – Niterói, R.J.

E-mail: clovis.orlando@uol.com.br