

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Farmácia
Área Análises Clínicas

**Amilóide Sérica A (SAA) e câncer: efeitos biológicos e mecanismos
de ação em glioblastomas multiformes**

Franciele Hinterholz Knebel

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Farmácia
Área Análises Clínicas

**Amilóide Sérica A (SAA) e câncer: efeitos biológicos e mecanismos
de ação em glioblastomas multiformes**

Franciele Hinterholz Knebel

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo

2014

Franciele Hinterholz Knebel

**Amilóide Sérica A (SAA) e câncer: efeitos biológicos e mecanismos
de ação em glioblastomas multiformes**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Liane Hinterholz Knebel e Luís Carlos Knebel pelo apoio e amor incondicional e por estarem sempre tão perto mesmo estando longe. Dedico-lhes esta conquista como gratidão.

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

(Galileu Galilei)

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que fizeram parte desta história...

A Deus que com seu amor infinito iluminou os meus caminhos, meus gestos e minhas palavras para que esta oportunidade se tornasse realidade.

Aos meus pais que com amor incondicional respeitaram e acreditaram em minhas escolhas. Agradeço o incentivo, o amor, o carinho, o abraço caloroso, a compreensão nos momentos difíceis e à vida.

À profa. Dra. Ana Campa pela oportunidade, pelo acolhimento, confiança e orientação criteriosa durante estes sete anos. Sou grata pela convivência, pelo aprendizado, incentivo, amizade, companheirismo, dedicação e pelas discussões construtivas que permearam esta pesquisa. Chefa... levo comigo muito de você, de seu amor à educação e à pesquisa.

À profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler e à profa. Dra. Mari Cleide Sogayar pela doação das linhagens celulares utilizadas neste estudo. À profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler pelas sugestões e discussões e por disponibilizar o laboratório de Patologia sempre que necessário. A todos os colegas e amigos do laboratório de Patologia: Manoela, Renato, Silvia, Fernanda, Silvana, Paula e Andréia que de alguma forma ou outra contribuíram para a realização desta tese. Em especial, a Msc. Raquel Brandão Haga pela dedicação, ensinamentos, construção das células silenciadas, bem como pelas discussões constantes. À Fernanda Faião Flores pelos westerns blot.

À profa. Dra. Primavera Borelli e ao prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock por disponibilizar o microscópio de fluorescência.

À profa. Dulcineia Saes Parra Abdalla por disponibilizar seu laboratório para a realização dos ensaios de RT-PCR. Sou grata também aos colegas que fazem parte de seu grupo de pesquisa: Marcela, Martina, Elaine, Tanise, Alda e Jac por me socorrerem sempre que aquela “xícara de açúcar faltou” para a realização dos experimentos.

À prof. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie e à Dra. Sueli Mieko Oba-Shinjo por disponibilizarem as amostras clínicas e o laboratório de Biologia Molecular e Celular da Faculdade de Medicina da USP para a realização dos experimentos de RT-PCR e imunohistoquímica. À Miyuki Uno pelo auxílio nos ensaios de RT-PCR e à Thais Galatro pela realização das lâminas de imunohistoquímica. Muito obrigada a todo grupo pelos ensinamentos e discussões.

À banca examinadora, que dispensou seu tempo para a leitura e estudo desta pesquisa.

Ao Dr. Christian Colin pela disponibilidade de desenhar os primers da proteína amiloide sérica A e pelas discussões sempre construtivas.

Aos meus amigos de todas as horas do laboratório de Bioquímica Clínica: Luziane Bellé, Renata Chaves Albuquerque, Silene Migliorini, Edson Mendes, Renan Clara, Mariana Branquinho, Janine Baptista, Alexandre Marchi, Thais Phalumbo, Marianna Olival, Fabíola Pessutto, Ariane Rivellis, Ana Carolina Ramos Moreno e Silvana Sandri, pelo companheirismo, as diárias conversas científicas, as discussões, o apoio, a algazarra, as descontrações, os sorrisos, os choros, as bobagens, enfim, este convívio engrandeceu a mim e a esta pesquisa.

À Luziane Bellé pela amizade, por dividir a bancada comigo, pelo empenho e destreza no auxílio aos experimentos, pelas discussões científicas, por dividir sonhos, pelos dias intensamente vividos, as mateadas, os risos, os choros, alegrias e tristezas, pelo ombro, pelo abraço, pelas festas, as viagens, enfim... muito obrigada por tudo que vivenciamos juntas! Levarei comigo todo o aprendizado oriundo da nossa convivência!

À Silene Migliorini pelos sete anos de convivência. Quantas coisas vivenciamos juntas!? Obrigada por tudo do fundo do meu coração, por todos os dias, pelo carinho, pelas conversas, pelo teu sorriso gostoso, pela amizade, pelos westerns blots, pelas amostras do HPLC, pelos orçamentos... rrsrrsrs. Com certeza me tornei uma pessoa melhor depois que te conheci.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica Clínica e Toxicológicas, em especial à Ana, à Rose e a Cláudia pela dedicação constante. Ao Jorge e a Elaine da sessão de pós-graduação. O trabalho de todos vocês foi essencial para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho.

Às minhas amigas: Karla Santiago, Simone Sartoretto, Gabriela Leite, Luziane Bellé, Maria Menezes, Renata Arcaldi, Camila Gallo, Renee de Oliveira, Sônia Buratto, Tainara Sartoretto, Melissa Tourino, Louise Reips, Sonia Maria Leite, Andrea Bordenali pelo suporte emocional. Agradeço as palavras de incentivo, os chamas, o carinho, o sorriso, as festas, o olhar de apoio, o abraço apertado, enfim... os maravilhosos momentos que passamos juntas.

A toda minha família pelo apoio e incentivo constante. Mesmo distantes cada ligação recebida e cada palavra dita foram imprescindíveis para que eu me tornasse mais forte para prosseguir nesta jornada.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, o meu muito obrigado.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro imprescindível para concretização desta pesquisa.

ÍNDICE

1	Revisão da Literatura	1
1.1	Amilóide Sérica A	1
1.2	Inflamação, Amilóide Sérica A e câncer	7
1.3	MMPs, ROS, câncer e SAA	11
1.4	Implicações das vias de sinalização celular - NFκB, MAPKs, NO e Ras no Câncer	15
1.5	Glioblastomas Multiformes (GBM) como modelo tumoral	18
2	Justificativa e Objetivos	22
3	Materiais e Métodos	24
3.1	Condições de Cultura e Manutenção das linhagens	24
3.2	Kit para determinação da atividade das MMP-2 e -9	24
3.3	Ensaio Clonogênico	25
3.4	Ensaio de Hipóxia	25
3.5	Determinação de espécies reativas de oxigênio	25
3.6	Knockdown dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 nos Glioblastomas pelo sistema lentiviral	26
3.7	Expressão Gênica	26
3.7.1	Extração de RNA Total	26
3.7.2	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time – PCR)	27
3.7.2.1	Preparação dos cDNAs	27
3.7.3	Expressão Gênica	27
3.7.3.1	Real Time-PCR quantitativo	27
3.8	Determinação da proteína SAA	29
3.9	Proliferação Celular por incorporação de [³ H]Timidina	30
3.10	Migração celular	30
3.11	Microscopia Imunofluorescente	31
3.12	Invasão celular	31
3.13	Western Blot	32
3.14	Imunohistoquímica	32
4	Análise estatística	33
5	Resultados e Discussão	34
5.1	SAA em duas linhagens de Glioblastomas	34
5.1.1	SAA afeta migração celular dos GBM	34
5.1.2	SAA afeta a invasão e a atividade de MMP-2 e -9 dos GBM	36
5.2	rSAA (5 µg/mL) não afeta a clonogenicidade dos GBM	39

5.3	Produção de ROS pelos gliomas.....	41
5.4	Hipóxia de 6 horas não altera a produção de SAA nos GBM	43
5.5	Indutores hepáticos clássicos da SAA também induzem expressão extra hepática de mRNA dos diferentes genes da SAA	45
5.6	GBM expressam TLR-2,TLR4 e RAGE	52
5.7	RAGE está envolvido na indução de proliferação por rSAA de células A172.....	54
5.8	TLR-4 participa da migração de A172.....	56
5.9	TLR-4 está envolvido na inibição de invasão por SAA em células A172.....	58
5.10	RAGE participa da migração e invasão de células T98G	61
5.11	Sinalização envolvida na indução de migração de GBM por SAA.....	65
6	Silenciamento da SAA.....	67
6.1	Desenvolvimento e validação de <i>knockdowns</i> para SAA em GBM	67
6.1.1	<i>Knockdown</i> de SAA1 e SAA1/2	68
6.1.2	<i>Knockdown</i> de SAA4.....	79
6.2	Efeitos dos <i>Knockdowns</i> SAA1, SAA1/2 e SAA4 em células A172	90
6.2.1	rSAA aumenta a transcrição de SAA1, SAA2 e SAA4 em células controle, enquanto em células <i>knockdowns</i> a transcrição de SAA foi prejudicada	90
6.2.2	<i>Knockdowns</i> de SAA1, SAA1/2 e SAA4 inibem a proliferação de A172.....	93
6.3	Células A172 <i>KDs</i> para SAA1, SAA1/2 e SAA4 migram e invadem menos.....	97
6.4	Efeitos dos <i>knockdowns</i> SAA1, SAA1/2 e SAA4 em células T98G.....	105
6.4.1	rSAA aumenta a transcrição de SAA1, SAA2 e SAA4 em células controle, enquanto em células <i>knockdowns</i> a transcrição de SAA foi prejudicada	105
6.4.2	<i>Knockdown</i> de SAA1 e SAA1/2 inibem a proliferação de células T98G.....	107
6.4.3	Células T98G <i>KDs</i> para SAA1, SAA1/2 e SAA4 migram e invadem menos	108
6.4.4	<i>Knockdowns</i> de SAA alteram a expressão de RAGE	115
6.5	SAA em tecidos normais de cérebro e em Glioblastomas.....	118
6.5.1	Transcrição de mRNA de SAA1 está aumentada em pacientes com GBM	118
6.5.2	Expressão de SAA está aumentada no tecido de pacientes com GBM	120
6.5.3	Pacientes diagnosticados com GBM apresentaram aumento sérico de SAA	123
7	Conclusões.....	131
6	Referências Bibliográficas.....	133

Lista de Abreviaturas

ADAM23: *Disintegrin and metallopeptidase domain 23*

AGI: Astrocitoma de grau I

AGII: Astrocitoma de grau II

AGIII: Astrocitoma de grau III

Apo-1: Apolipoproteína I

ATP: *Adenosine Triphosphate*

CCL20: *Chemokine (C-C motif) ligand 20*

CD36: *Cluster of differentiation 36* (receptor multifuncional de membrana celular)

CD163: *Cluster of differentiation 163* (receptor de superfície celular de macrófagos)

CLA-1: CD36

CXCR: *Chemokine receptor*

DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSO: Dimetil sulfóxido

ELISA: Enzyme – Linked Immunosorbent Assay

ERK1/2: *Extracellular-signal-regulated kinases 1/2*

FPRL-1 ou FPR2: *N-formyl peptide receptor 2*

GBM: Glioblastoma multiforme

HMGB1: *High-mobility group protein B1*

HDL: *High-density lipoprotein*

IFN- γ : *Interferon-gamma*

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-10: Interleucina-10

IL-2: Interleucina-2

IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

KDs: *Knockdowns*

LDL: *Low Density Lipoprotein*

LPS: lipopolissacarídeo

NF- κ B: *Factor nuclear kappa B* (fator de transcrição nuclear kappa B)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* (proteína kinase ativada por mitógenos)

MEC: *Matrix extracelular* (matriz extracelular)

MMPs: *Matrix metalloproteinases* (metaloproteinases de matriz)

NO: *Nitric oxide* (óxido nítrico)

NOS: *Nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintases)

PBS: *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato)

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

RAGE: *Receptor for Advanced Glycation End-products*

RECK: *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*

ROS: *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

RT-PCR: Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

SAA: Amilóide sérica A

Sc: *Scramble*

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TIMP: *Tissue inhibitors of metalloproteinases*

TLR: Receptor *Toll-like*

TLR2: Receptor *Toll-like -2*

TLR4: Receptor *Toll-like -4*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral-alfa)

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

VLDL: *Very Low Density Lipoprotein* (lipoproteína de muita baixa densidade)

wt: *wild type* (selvagem)

Índice de Quadros e Figuras

Quadro 1: Neoplasias em que foram encontradas expressões aumentadas de SAA.....	10
Quadro 2: Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	28
Quadro 3: Eficiência no silenciamento do gene SAA1 e efeito no crescimento em células A172, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.....	70
Quadro 4: Eficiência no silenciamento do gene SAA2 e efeito no crescimento em células A172, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.....	71
Quadro 5: Eficiência no silenciamento do gene SAA1 e efeito no crescimento em células T98G, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.....	75
Quadro 6: Eficiência no silenciamento do gene SAA2 e efeito no crescimento em células T98G, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.....	76
Quadro 7: Eficiência e efeitos observados após silenciamento do gene SAA4 usando diferentes plasmídeos em células A172.....	80
Quadro 8: Eficiência e efeitos observados após silenciamento do gene SAA4 usando diferentes plasmídeos em células T98G.....	84
Figura 1: Estrutura monomérica de SAA1.1 humana.....	1
Figura 2: Efeitos da SAA em células tumorais.....	4
Figura 3: Receptores de superfície celular com os quais SAA tem sido descrita por interagir e a via efetora intracelular correspondente.....	5
Figura 4: Metaloproteinases de matriz são expressas como pró-proteínas.....	12
Figura 5: Aspecto morfológico das células A172 e T98G.....	20
Figura 6: SAA afeta a migração das células de GBM.....	35
Figura 7: rSAA inibe a invasão de células A172 e aumenta a invasão de células T98G.....	37
Figura 8: Atividade total de MMP-2 e MMP-9 no sobrenadante das células A172 e T98G estimuladas com rSAA.....	38
Figura 9: SAA não afeta o número, intensidade e área das colônias de células A172.....	40
Figura 10: SAA não afeta o número, intensidade e área das colônias de células T98G.....	41
Figura 11: Produção de ROS pelas células A172 e T98G estimuladas com rSAA.....	42
Figura 12: Cinética da produção de ROS pelas células A172 e T98G na presença e ausência de rSAA.....	43

Figura 13: Transcrição de SAA nos GBM submetidos a hipóxia de 6h.....	44
Figura 14: Hipóxia de 6 h não altera a produção da proteína SAA.....	44
Figura 15: TNF- α induziu transcrição de mRNA de SAA1 nas células A172.....	46
Figura 16: TNF- α e IL-1 β induziram a transcrição de mRNA do gene SAA2 nas células A172.....	47
Figura 17: TNF- α e IL-1 β induziram a transcrição de mRNA do gene SAA4 nas células A172.....	47
Figura 18: IL-6, IL-1 β e TNF- α induziram a transcrição de mRNA do gene SAA1 nas células T98G.....	48
Figura 19: IL-6, IL-1 β e TNF- α induziram a transcrição de mRNA do gene SAA2 nas células T98G.....	49
Figura 20: IL-6, IL-1 β e TNF- α induziram a transcrição de mRNA do gene SAA4 nas células T98G.....	50
Figura 21: Transcrição de mRNA dos receptores TLR-2, TLR-4 e RAGE nos GBM.....	53
Figura 22: Expressão de TLR2, TLR4 e RAGE nas células A172 e T98G.....	53
Figura 23: Efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na proliferação induzida por rSAA em células A172.....	54
Figura 24: Efeito inibitório do inibidor de NF- κ B, PD98059 e L-NAME na indução de proliferação de células A172 por rSAA.....	56
Figura 25: Imagens do efeito do anticorpo neutralizante anti-TLR4 mostrando reversão da inibição de migração de células A172 por rSAA.....	57
Figura 26: Anticorpo neutralizante-TLR4 preveniu a inibição de migração de células A172 por rSAA.....	58
Figura 27: Imagens do efeito do anticorpo neutralizante anti-TLR4 mostrando reversão da inibição de invasão de células A172 por rSAA.....	59
Figura 28: Anticorpo neutralizante-TLR4 preveniu a inibição de invasão de células A172 por rSAA.....	60
Figura 29: Imagens do efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na migração de células T98G induzida por rSAA.....	62
Figura 30: Efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na indução de migração de células T98G por rSAA.....	63
Figura 31: Imagens do efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na indução de invasão de células T98G por rSAA.....	64
Figura 32: Efeito inibitório do anticorpo neutralizante-RAGE na indução de invasão de células T98G por rSAA.....	65
Figura 33: Efeito inibitório de PD98059 e do inibidor farnesyltransferase na indução de migração de células T98G por rSAA.....	66

Figura 34: Eletroforese em gel de agarose indica que os DNA purificados são os plasmídeos de interesse inseridos no vetor pLKO.....	68
Figura 35: Transcrição de mRNA do gene SAA1 em células A172 silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA1/2.....	70
Figura 36: Transcrição de mRNA do gene SAA2 em células A172 silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA1/2.....	71
Figura 37: Produção da proteína SAA1/2 em células A172.....	72
Figura 38: Aspecto morfológico da linhagem A172 durante silenciamento com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2.....	73
Figura 39: Aspecto morfológico da linhagem A172 durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2.....	74
Figura 40: Transcrição de mRNA do gene SAA1 em células T98G silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA1/2.....	76
Figura 41: Transcrição de mRNA de SAA2 em células T98G silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA1/2.....	77
Figura 42: produção da proteína SAA1/2 por células T98G.....	77
Figura 43: Aspecto morfológico da linhagem T98G durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2.....	78
Figura 44: Aspecto morfológico da linhagem T98G durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2.....	79
Figura 45: Transcrição de mRNA do gene SAA4 em células A172 silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA4.....	80
Figura 46: Inibição da produção de SAA4 nas células A172.....	81
Figura 47: Imagem do western blot mostrando inibição da proteína SAA4 em células A172.....	81
Figura 48: Plasmídeos shRNA 290, 376 e 381 inibiram a proteína SAA4 em células A172.....	82
Figura 49: Aspecto morfológico da linhagem A172 durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA4.....	83
Figura 50: Transcrição de mRNA do gene SAA4 em células T98G silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA4.....	84
Figura 51: Inibição na produção de SAA nas células T98G.....	85
Figura 52: Imagem do western blot mostrando inibição da proteína SAA4 em células T98G.....	85
Figura 53: Plasmídeos shRNA 290, 381 e 293 inibiram a proteína SAA4 em células T98G.....	86
Figura 54: Aspecto morfológico da linhagem T98G durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos shRNA do gene SAA4.....	87

Figura 55: Células scramble e vetor pLKO não alteram a expressão dos diferentes genes da SAA em células A172 se compararmos às células wt.....	88
Figura 56: Células scramble e vetor pLKO não alteram a expressão dos diferentes genes da SAA em células T98G se compararmos às células wt.....	89
Figura 57: Células A172 scramble apresentaram o mesmo padrão de resposta proliferativo observado para células A172 wt quando induzidas por rSAA.....	90
Figura 58: rSAA induz aumento da transcrição de todos genes da SAA em células A172.....	92
Figura 59: rSAA aumenta a expressão de SAA4 em células controle e KDs para SAA1 e SAA1/2 em A172.....	93
Figura 60: <i>Knockdowns</i> dos genes SAA1/2 e SAA4 inibiram proliferação das células A172.....	95
Figura 61: <i>Knockdowns</i> da SAA apresentaram prejuízo na fosforilação de ERK1/2 em células A172.....	96
Figura 62: rSAA aumenta a fosforilação de ERK1/2, enquanto KDs de SAA apresentam prejuízo na fosforilação de ERK1/2.....	96
Figura 63: <i>Knockdowns</i> da SAA prejudicam a fosforilação de ERK1/2.....	97
Figura 64: Imagens mostram que knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 afetam a migração das células A172.....	99
Figura 65: <i>knockdowns</i> de SAA1, SAA1/2 e SAA4 afetam a migração das células A172.....	100
Figura 66: KDs de SAA1, SAA1/2 e SAA4 induzem reorganização do citoesqueleto de actina de células A172.....	102
Figura 67: Imagem mostra que Knockdowns de SAA1 e SAA1/2 diminuiu a invasão de células A172.....	104
Figura 68: <i>Knockdowns</i> de SAA1 e SAA1/2 diminuiu a invasão de células A172.....	105
Figura 69: rSAA induz aumento da transcrição de todos genes da SAA em células T98G.....	107
Figura 70: <i>Knockdowns</i> dos genes SAA1 e SAA1/2 inibiu proliferação das células T98G.....	108
Figura 71: Imagem mostra que knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 afetaram a migração das células T98G.....	110
Figura 72: KDs de SAA1, SAA1/2 e SAA4 inibem a migração de células T98G.....	111
Figura 73: KD de SAA1/2 e KD de SAA4 parecem induzir reorganização do citoesqueleto de actina e fenótipo migratório de células T98G.....	112
Figura 74: Imagem mostra que knockdown de SAA1, SAA1/2 e SAA4 diminuíram a invasão de células T98G.....	114

Figura 75: <i>Knockdowns</i> de SAA1, SAA1/2 e SAA4 diminuíram a invasão de células T98G.....	115
Figura 76: <i>Knockdowns</i> de SAA inibiram transcrição de mRNA de RAGE.....	116
Figura 77: <i>Knockdowns</i> de SAA inibiram a expressão de RAGE.....	117
Figura 78: Tecido cerebral de pacientes com GBM apresentaram transcrição de mRNA de SAA1 elevada comparado a tecido cerebral não neoplásico e de pacientes diagnosticados com grau I, II e III de gliomas.....	119
Figura 79: Transcrição de mRNA de SAA2 não foi detectada em tecido cerebral de pacientes sem neoplasia ou portadores de AGI, AGII e AGIII.....	119
Figura 80: Transcrição de mRNA do gene SAA4 não foi detectado no cérebro de pacientes sem neoplasia ou diagnosticados com GBM.....	120
Figura 81: Tecidos cerebrais de pacientes diagnosticados com GBM apresentaram elevada expressão de SAA se comparado ao controle (NN) e ao tecido cerebral de pacientes com AGI, AGII e AGIII.....	121
Figura 82: Tecidos cerebrais de pacientes diagnosticados com GBM apresentaram elevada expressão de SAA se comparado ao cérebro sem neoplasia e ao tecido de cérebro de pacientes com AGI, AGII e AGIII.....	121
Figura 83: Tecido cerebral de pacientes com GBM apresentaram aumento de expressão de SAA se comparado ao tecido de cérebro sem neoplasia e aos estadios mais baixos dos gliomas.....	122
Figura 84: Pacientes com GBM apresentaram concentrações séricas de SAA elevadas se comparado aos pacientes sem neoplasias.....	123
Figura 85: Western blot representativo do aumento de SAA no soro de pacientes com GBM.....	124
Figura 86: Curva de sobrevida - Kaplan Meier - dos pacientes com GBM em função da expressão de SAA1.....	125
Figura 87: Curva de sobrevida – Kaplan Meier - dos pacientes com GBM em função das concentrações séricas de SAA1.....	126
Figura 88: Correlação da concentração sérica da SAA de pacientes com GBM em função do tempo de sobrevida.....	126
Figura 89: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de CXCR4 em tecido cerebral de 86 pacientes com GBM.....	127
Figura 90: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de CXCR7 em tecido cerebral de 86 pacientes com GBM.....	128
Figura 91: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de CD163 em tecido cerebral de 83 pacientes com GBM.....	128
Figura 92: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de HIF-1 α em tecido cerebral de 86 pacientes com GBM.....	129
Figura 93: Mecanismo de ação da SAA em GBM.....	131

RESUMO

KNEBEL, F. H. **Amilóide sérica A (SAA) e câncer: efeitos biológicos e mecanismos de ação em glioblastomas multiformes.** 2014. 176 f. (Tese de doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Células tumorais têm sua proliferação e mobilidade modificada por diversos fatores de crescimento, citocinas e mediadores inflamatórios, dentre os quais a amilóide sérica A (SAA). Estudos prévios do nosso grupo mostraram o efeito direto da SAA em processos de proliferação, migração e invasão de células de glioblastoma multiforme (GBM), A172 e T98G. Neste estudo nós complementamos resultados prévios de migração e invasão; avaliamos SAA como possível indutora de moléculas importantes para a invasividade do tumor, como as MMP-2 e -9 e ROS; realizamos ensaio clonogênico com a intenção de investigar uma possível contribuição da rSAA no estágio inicial de desenvolvimento do tumor; avaliamos o impacto da hipóxia na expressão dos diferentes genes da SAA; estimulamos as células com indutores hepáticos clássicos da SAA e analisamos a possibilidade destes induzirem os diferentes genes da SAA em células tumorais; avaliamos possíveis receptores e vias de sinalizações envolvidas nos processos de proliferação, migração e invasão. Construímos *knockdowns* (KDs) dos genes da SAA de fase aguda (SAA1 e 2) e constitutiva (SAA4) e avaliamos a função de cada um deles para a morfologia e para os processos de proliferação, migração e invasão de GBM. Por fim investigamos SAA como possível biomarcadora de gliomas em amostras clínicas. Nossos resultados sugerem que rSAA afetou a atividade das MMP-2 e -9 e a produção de ROS em ambos GBM, mas não se mostrou clonogênica. As citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β , mas não a hipóxia, foram capazes de induzir os diferentes genes da SAA. A adição de rSAA às culturas celulares estimulou a transcrição dos diferentes genes da SAA, sugerindo a ativação de mecanismos intracelulares retroalimentados. Efeitos pró-tumorais da rSAA parecem ser viabilizados via RAGE, enquanto efeitos anti-tumorais parecem ser induzidos via TLR-4. Pela primeira vez mostramos que SAA induz aumento de RAGE. KDs da SAA inibiram proliferação, migração e invasão, sugerindo que SAA seja um produto tumoral importante para a manutenção do fenótipo invasivo de GBM. A adição de SAA exógena reverteu grande parte dos efeitos nas células T98G KD, enquanto células A172 KD responderam parcialmente à rSAA. KDs da SAA sugerem a mesma como mantenedora da morfologia das células de GBM. De maneira inédita mostramos que o gene SAA4 até então descrito como um gene constitutivo de função desconhecida é importante para a proliferação, migração e invasão de GBM. Nós especulamos que os efeitos diferenciados induzidos por rSAA nos GBM estejam associados à natureza multiligante da SAA e às diferenças genéticas dos GBM. Pacientes com GBM apresentaram aumento significativo na transcrição e expressão de SAA1 no tecido tumoral, bem como aumento sérico de SAA. A correlação na expressão de SAA1 com moléculas importantes para progressão tumoral, como CXCR4, CXCR7, CD163 e HIF-1 α também a identificam como uma proteína associada à malignidade.

Palavras chaves: Amilóide sérica A. Migração. Proliferação. Invasão. Gliomas.

ABSTRACT

KNEBEL, F.H. **Serum amyloid A (SAA) and cancer: biological effects and mechanisms of action in glioblastomas multiformes**. 2014. 176 f. (Tese de doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Tumor cells have their proliferation and migration modified by several growth factors, cytokines and inflammatory mediators, such as serum amyloid A (SAA). Previous studies from our group showed the direct effect of SAA on proliferation, migration and invasion of glioblastoma multiforme (GBM) cells, A172 and T98G. In this study we complemented previous migration and invasion data; evaluated SAA as possible inducer of MMP-2, -9 and ROS; performed clonogenic assay to investigate a possible contribution of rSAA in the early stage of tumor development; evaluated the impact of hypoxia on the expression of different genes of SAA; stimulated the cells with classic inducers of hepatic SAA and analyzed the possibility of these different genes to induce SAA in tumor cells; evaluated possible receptors and signaling pathways involved in proliferation, migration and invasion processes. SAA *knockdowns* (KDs) were made for acute phase (SAA1 and 2) and constitutive protein (SAA4) and evaluated their role in cell proliferation, migration, morphology and invasion. Finally it was investigated SAA as a possible biomarker of glioma grade in clinical samples. Our results suggest that rSAA affects MMP-2 and -9 activity and ROS production in both GBM, but did not affect clonogenicity. IL-6, TNF- α and IL-1 β , but not hypoxia, were able to induce SAA expression. rSAA addition to cell cultures stimulated transcription of the three different SAA genes, suggesting the activation of intracellular feedback mechanisms. Pro-tumor effects of rSAA seem to occur via RAGE and anti-tumor effects appear to be induced via TLR-4. This was the first time that induction of RAGE triggered by rSAA was shown. Proliferation, migration and invasion were inhibited in SAA KDs, suggesting that SAA is an important tumoral product for the maintenance of the invasive phenotype of GBM. The addition of exogenous SAA largely reversed the effects on SAA KDs T98G cells, whereas SAA KDs A172 cells partially responded to the rSAA. The findings with SAA KDs suggest that SAA affect cell morphology. Another new contribution from our study was that SAA4, a constitutive gene with unknown function, was important for the proliferation, migration and invasion of GBM and it can be induced by rSAA, IL-6, TNF- α and IL-1 β . We speculate that the different effects induced by rSAA in GBM are associated with the affinity of SAA to different receptors and the different genetic backgrounds of GBM. Patients with GBM showed a significant increase in the transcription and expression of SAA1 in tumor tissue as well as increased serum SAA. The correlation between the expression of SAA1 with important molecules for tumor progression, such as CXCR4, CXCR7, CD163 and HIF-1 α also identified SAA as a protein associated with malignancy.

Keywords: Serum amyloid A. Migration. Proliferation. Invasion. Gliomas.

1 Revisão da Literatura

1.1 Amilóide Sérica A

A proteína Amilóide Sérica A (SAA) é uma apolipoproteína de 104 (SAA1 e SAA2) ou 112 (SAA4) aminoácidos e peso molecular de 12-14 kDa, altamente conservada entre as espécies (**Figura 1A e 1B**) e por este motivo tem se suposto que SAA desempenha uma função vital para a sobrevivência do indivíduo. SAA foi encontrada em humanos sob quatro isoformas – SAA1, SAA2, SAA3 e SAA4. As isoformas SAA1 e SAA2 são genes que codificam SAA de fase aguda, enquanto SAA3 foi identificada como um pseudogene e SAA4 é um gene que codifica a proteína constitutiva SAA4, cuja função permanece desconhecida (Uhlar & Whitehead, 1999). Em concentrações basais, as concentrações séricas de SAA variam de 1-10 μ g/mL. Na resposta inflamatória aguda, o aumento da concentração sérica desta apolipoproteína chega a 1000 vezes. A elevação inicial de SAA na resposta de fase aguda inicia 3 a 6 horas depois do estímulo inflamatório, alcança um pico no terceiro dia e no quarto dia há um declínio gradual na concentração plasmática e retorno a concentrações basais depois de 5-7 dias (Gabay & Kushner, 1999; Yamada et al., 2000). A meia-vida da SAA é de aproximadamente 1 dia, mas pode ser maior durante a resposta de fase aguda (para revisão ver Eklund, Niemi & Kovanen, 2012).

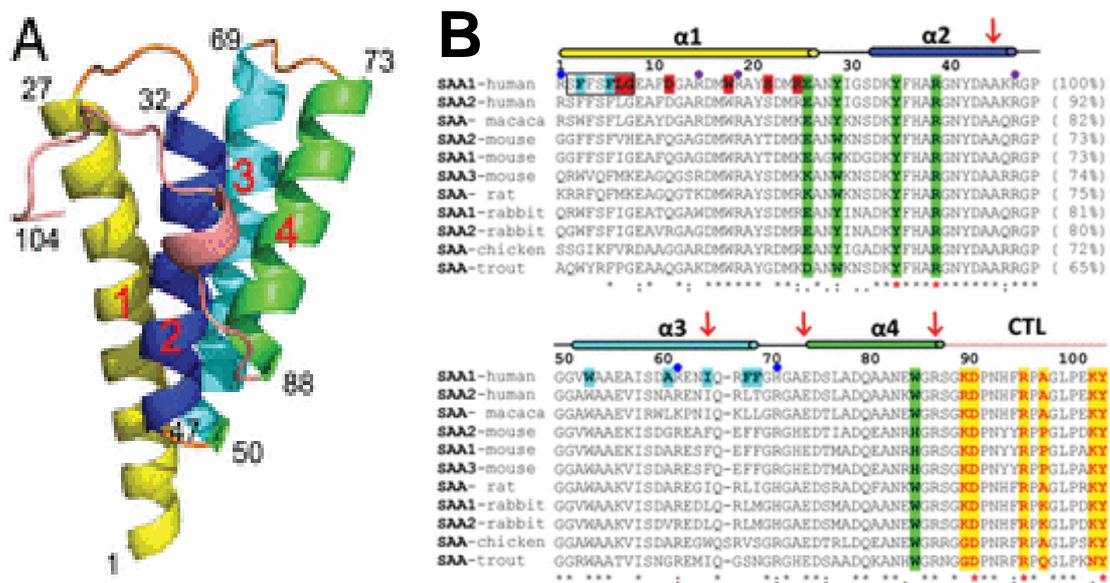


Figura 1: Estrutura monomérica de SAA1.1 humana. **(A)** Representação da estrutura cristalina da SAA1.1 com suas cadeias α -hélices 1 (resíduos 1–27), 2 (resíduos 32–47), 3 (resíduos 50–69) e 4 (resíduos 73–88) e porção C-terminal (resíduos 89–104) coloridas em amarelo, azul, turquesa e verde, respectivamente. **(B)** Alinhamento da sequência das proteínas SAA1 e 2 em diferentes espécies. Retirado e adaptado de: Lu et al., 2014, *Proc Natl Acad Sci*.

SAA quando sintetizada é incorporada dentro de lipoproteínas, principalmente à lipoproteína de alta densidade (HDL), mas pode também estar associada com lipoproteínas apo-B100, LDL e VLDL. Na circulação sanguínea, SAA é transportada até o foco inflamatório associada a HDL. A região α -hélice na porção amino terminal da SAA permite a ligação da SAA à HDL, após deslocamento da apo-I por competição, uma vez que SAA se liga ao mesmo sítio da apo-I. Sua dissociação no foco inflamatório torna a mesma um potente estímulo de células inflamatórias (Furlaneto et al., 2000). Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa suporta a hipótese que HDL inibe o efeito promovido pela SAA quando transportada no sangue associada a mesma (Franco, Sandri & Campa, 2011). O estudo mostrou que a produção de TNF- α por SAA em células THP-1 foi maior quando estas se encontravam em um meio deficiente de soro. A adição de HDL inibiu a produção de TNF- α de maneira específica (Franco, Sandri & Campa, 2011).

As inúmeras propriedades imunomodulatórias da SAA sobre células do sistema imune e em doenças inflamatórias vêm sendo descritas há anos. Badolato e seus colaboradores (1994) mostraram que SAA é quimioatraente para leucócitos polimorfonucleares e monócitos *in vitro* e *in vivo*. Preciado-Patt e seus colaboradores (1996) mostraram que SAA complexada a matriz extracelular induz produção de TNF- α por linfócitos. He, Sang & Ye (2003) mostraram que SAA induz a produção de IL-8 por neutrófilos através do receptor FPRL1. Lee e colaboradores (2005; 2008) mostraram que SAA ligada a FPRL1 induz angiogênese e hiperplasia sinovial e que concentrações baixas de SAA estimulam a expressão de TNF- α (citocina pró-inflamatória), contribuindo para o aumento da inflamação, enquanto, concentrações elevadas de SAA estimulam a expressão de IL-10 (antiinflamatória), contribuindo para inibição da inflamação. Ainda em 2006, Mullan e colaboradores (2006) constataram que SAA induz a expressão de moléculas de adesão, angiogênese e degradação de matriz na artrite reumatóide.

Em 2008, foi mostrado que SAA induz em neutrófilos, a produção de ROS (Bjorkman et al., 2008). Migita et al. (2009) sugeriu que SAA pode estar envolvida no

recrutamento de linfócitos em sinoviócitos de artrite reumatóide por induzir a secreção da quimiocina CCL20. Posteriormente, foi encontrado que SAA induz a expressão do fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF) e neutrofilia via TLR-2 em macrófagos de camundongo (He et al., 2009). Em 2010, Connolly e colaboradores constataram que SAA induz migração, angiogênese e inflamação em células sinoviais de artrite reumatoide humana.

Connolly, Veale & Fearon (2011) mostraram que SAA promove rearranjo do citoesqueleto, interage com a matriz celular e promove migração de sinoviócitos de artrite reumatóide. Recentemente, estudo realizado por Yu e seus colaboradores (2014) mostrou que SAA induziu diferentes respostas em culturas primárias de duas células gliais: astrócitos e micróglia. Nas células da microglia aumentou a viabilidade, enquanto em astrócitos diminuiu a viabilidade, bem como induziu mudanças morfológicas na micróglia, mas não em astrócitos.

Nosso grupo de pesquisa tem contribuído para a compreensão dos efeitos biológicos da SAA em células do sistema imune, bem como em diferentes doenças. Dentre os efeitos já descritos, SAA é capaz de induzir a expressão de mRNA e liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-1ra) por neutrófilos e monócitos, aumentar o *pool* de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela sensibilização de leucócitos (Furlaneto & Campa, 2000; Furlaneto et al., 2000; Ribeiro et al. 2003; Hatanaka, Ribeiro & Campa, 2003; Hatanaka et al. 2004), além de ser uma proteína indutora da produção de óxido nítrico (NO) via indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em células peritoneais de camundongos (Sandri, et al. 2008). Neste mesmo trabalho apontamos ainda o receptor Toll-like-4 (TLR-4) como responsável por tais efeitos. Mostramos também que SAA induz proliferação de fibroblastos (Hatanaka et al., 2011), pré-adipócitos (Filippin-Monteiro et al., 2011) e de GBM, assim como afeta a migração e invasão destas células tumorais (**Figura 2**) (Knebel et al., 2013). Hipóxia induziu expressão de SAA3 em pré-adipócitos 3T3-L1 (de Oliveira et al., 2013) e, recentemente descrevemos que SAA regula a atividade de metaloproteinases de matriz e a invasão de células de trofoblasto de placenta via TLR4 (Sandri et al, 2014).

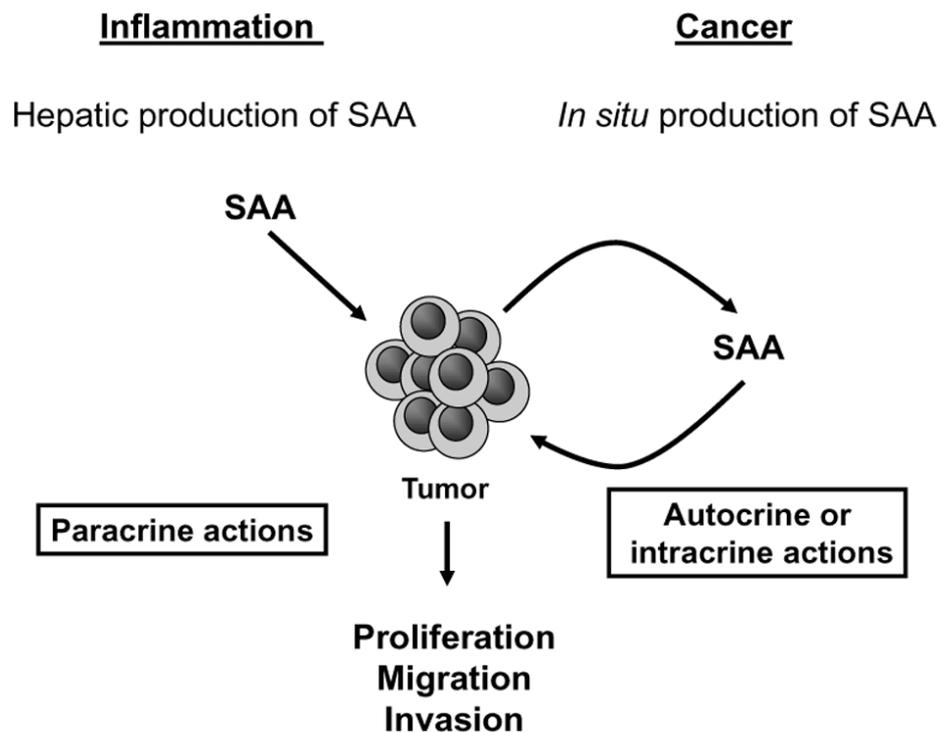


Figura 2: Efeitos da SAA em células tumorais. Células de GBM podem ser afetadas pela SAA produzida pelo fígado durante processo inflamatório (ações parácrinas) e pela SAA sintetizada pelas próprias células tumorais (ações autócrinas ou intrácrinas). O efeito na proliferação, migração e invasão de células de glioma depende do tipo celular e concentração de rSAA. Retirado de: Knebel et al., 2013, *Mediators of Inflammation*.

A indução da síntese da SAA está diretamente relacionada a fatores envolvidos na resposta inflamatória de fase aguda, como: lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), caseína, turpentina, nitrato de prata, algumas citocinas, como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-2, interferon-gama (IFN- γ) e o fator neutrófico ciliar (para revisão ver Urieli-shoval, Linke & Matzner, 2000). Apesar do fígado ser o principal produtor de SAA em resposta a várias injúrias, como trauma, infecção e inflamação (Urieli-shoval, Linke & Matzner, 2000), sítios extra-hepáticos como células do músculo liso, células endoteliais (Kumon et al. 1997), monócitos (Yamada et al., 2000), adipócitos (Poitou et al., 2005), microglia de pacientes com doença de alzheimer, tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, placas ateroscleróticas (Rodrigues et al., 2003; Bogdan, 2001; Sodhi & Biswas, 2001) e até mesmo células tumorais são capazes de produzir SAA (Gutfeld et al., 2006).

A maioria das funções descritas para SAA são mediadas pela interação com vários receptores de superfície celular (**Figura 3**). Até o momento foram descritos os seguintes receptores para SAA: Tanis, CLA-1, RAGE, FPRL1, TLR-4, TLR-2, CD36

e P2X7. Tanis é o receptor hepático para SAA regulado por glicose (Walder, 2002). CLA-1 é amplamente expresso em monócitos e através desse receptor SAA promove liberação de IL-8 e ativação da via de sinalização das MAPK (Baranova et al., 2005). O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) foi descrito como um multiligante encontrado em células mononucleares, proposto como propagador da inflamação e ligante para SAA (Cai et al., 2007). O *formyl peptide receptor-like 1* (FPRL1), cuja nomenclatura atual é FPR2 é um receptor transmembrana associado à proteína G (Lee et al., 2008). TLR-4 foi sugerido como ligante para SAA por Sandri et al. (2008), induzindo a produção de óxido nítrico por macrófagos. TLR-2 foi sugerido como um receptor para SAA por Madan e Amar (2008) quando o estímulo com um agonista de TLR-2 induziu aumento das concentrações séricas de SAA. CD36 foi apontado por Baranova, et al. (2010) como um receptor que media atividades pró-inflamatórias da SAA, tais como, liberação de citocinas. Por fim, o receptor P2X7 descrito como um receptor para ATP (para revisão ver Volonté et al., 2012) também tem sido descrito por interagir com SAA. Entretanto, a presença do mesmo em células do sistema imune sugere que P2X7 possa regular o sistema imune. A inibição do mesmo impediu a secreção de IL-1 β induzida por SAA, sugerindo que SAA ativa inflamossoma via P2X7 (para revisão ver Eklund, Niemi & Kovanen, 2012).

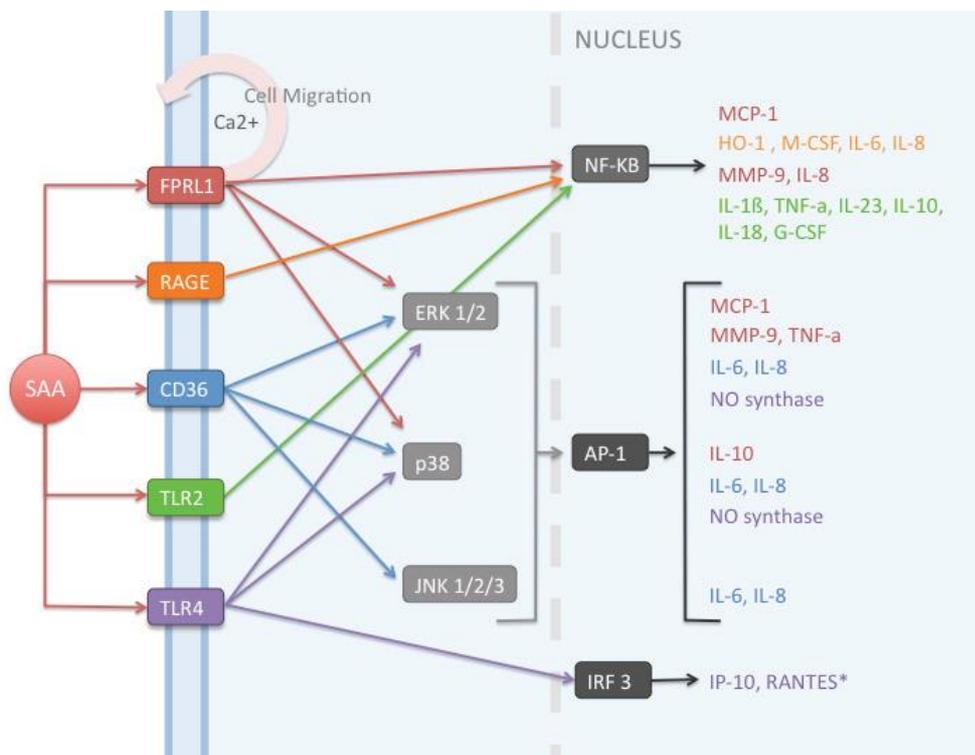


Figura 3: *Receptores de superfície celular com os quais SAA tem sido descrita por interagir e a via efetora intracelular correspondente. IL, interleucina; M-CSF, fator estimulador de colônias de macrófagos; NF, fator nuclear; NO, óxido nítrico; TNF, fator de necrose tumoral; G-CSF, fator estimulador da colônia de granulócitos; HO-1, heme oxigenase 1; MCP, proteína quimioatraente de monócito; MMP, metaloproteinase de matriz. Resultados não publicados de 2012 estão marcados com asterisco. Retirado de: Eklund, Niemi & Kovanen, 2012, Critical Reviews™ in Immunology.*

Dentre os receptores acima citados, vale mencionar aqueles que foram descritos em células do SNC. A expressão de FPR2, inicialmente descrita em leucócitos, foi mostrada em diferentes tipos celulares, incluindo células da microglia, astrócitos e neurônios (para revisão ver Migeotte et al., 2006; Le et al., 2002; Becker et al., 1998; Harada et al., 2004). De acordo com Su et al. (1999), SAA ligada ao FPR2 (antigo FPRL1) é quimioatraente para monócitos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos T e estimula a produção de metaloproteinases, citocinas e seus receptores. Zhou e seus colaboradores (2005) também mostraram que FPR2 é altamente expresso em células de glioma humano e seu silenciamento reduziu a tumorigenicidade de células de GBM. Além disso, em células monocíticas, a supressão da interação da SAA com o receptor FPR2 parece inibir a atividade das MMP-2 e MMP-9 (Lee et al., 2005). Estes achados podem apontar para uma importante participação do FPR2 no câncer.

O receptor RAGE também foi identificado em neurônios, microglia, astrócitos (Brett et al., 1993; Yan et al., 1996) tumores cerebrais, de mama, cólon, pulmão, próstata, ovário, linfoma e melanoma (para revisão ver Logsdon et al., 2007). Embora o conhecimento da função molecular de RAGE durante a transformação ou progressão neoplásica seja limitado, alguns estudos suportam uma associação direta entre ativação de RAGE e proliferação, sobrevivência, migração e invasão de células tumorais (Logsdon et al., 2007; Abe & Yamagishi, 2008). Yan e seus colaboradores (2000) mostraram que a interação de RAGE com SAA em um modelo experimental de amiloidose resultou em aumento da expressão de M-CSF, o qual pode contribuir para o crescimento de tumores.

O receptor TLR2 foi encontrado principalmente expresso na microglia, astrócitos e neurônios e tem sido associado a isquemia (para revisão ver Wang, Ge & Zhu, 2013). A expressão de TLR4 tem sido descrita em cérebro humano e tem sido associada a regulação de alguns processos fisiológicos como neurogênese (ver revisão Trotta et al., 2014). O aumento na ativação de TLR4 tem sido associado à

exacerbação da neuro degeneração e por isto o mesmo tem sido estudado amplamente em desordens degenerativas, tais como: doença de Alzheimer's, esclerose múltipla e doença de Parkinson's (ver revisão Trotta et al., 2014). Além disso, a expressão de TLR4 tem sido descrita em GBM, bem como em células A172 (Sarrazy et al., 2011; Tewari et al., 2012).

O receptor P2X7 tem sido sugerido por ser expresso em astrócitos (para revisão ver Rubini et al., 2014). A estimulação de P2X7 em astrócitos libera glutamato (Duan et al. 2003), ATP (Suadiciani et al. 2009) e IL-1 β (Abbracchio & Ceruti, 2006) e tem sido relacionado a isquemia cerebral, bem como tumorigênese (para revisão ver Bai & Li, 2013).

1.2 Inflamação, Amilóide Sérica A e câncer

O câncer é uma doença inflamatória crônica causada por anomalias no material genético de células transformadas (Balkwill & Mantovani, 2002). Estas anomalias podem ser resultado dos efeitos de carcinógenos, como o tabagismo, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos (Bharat et al. 2006). Neste caso, alterações celulares, resultantes da proliferação celular anormal, descontrolada, autônoma e com expansão de clones de células geneticamente alteradas, conduz a destruição de tecidos adjacentes e desenvolvimento de metástases, envolvendo uma série de eventos celulares e imunológicos (Abbas, Lichtman, Pillai, 2007).

É crescente a quantidade de trabalhos que apontam a inflamação crônica como fator determinante à predisposição ao câncer (para revisão ver Klampfer, 2011; Wu et al., 2014). Entretanto, o mecanismo pelo qual inflamação crônica pode promover desenvolvimento tumoral em humanos não é totalmente conhecido. É sabido que mediadores inflamatórios são capazes de causar alterações genéticas nas células que impactam em variantes metastáticas (Colotta, 2009; Solinas et al., 2010). Dentre estes mediadores, pode-se citar: citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais podem ser produzidos por células imunes ativadas recrutadas para o microambiente do tumor ou pelas próprias células tumorais, promovendo na maioria das vezes crescimento do tumor (Klampfer, 2011). Dentre os mediadores inflamatórios mais comuns, pode-se citar: IL-6, IL-1 e TNF- α , os quais induzem no fígado a produção e liberação de proteínas de fase aguda,

como a amilóide sérica A. SAA é quimiotática para neutrófilos, linfócitos e monócitos, os quais contribuem para resolução da inflamação e restabelecimento da homeostasia do organismo.

A ativação de NF- κ B por citocinas pró-inflamatórias tem sido apontada como uma via de conexão entre inflamação e câncer, uma vez que sua ativação está relacionada com proliferação e sobrevivência de células tumorais (Allavena et al., 2008). Considerando que SAA também é ativada por citocinas pró-inflamatórias e que estudos mostram que SAA estimula a ativação transcripcional de NF- κ B em fibroblastos sinoviais reumatóides, induzindo a expressão de IL-6 e IL-8 (Okamoto et al., 2008), bem como aumentando a expressão de IL-8 via NF- κ B em linhagem celular de cólon (Jijon et al., 2005), torna-se interessante avaliar a possibilidade da SAA induzir proliferação e sobrevivência tumoral através de NF- κ B e portanto ser também um elemento de ligação entre inflamação e câncer.

O fato de tumores serem acompanhados de inflamação crônica, inúmeras associações de SAA com câncer tem sido feitas, uma vez que em condições inflamatórias crônicas SAA é produzida de maneira tênue e constante. Já em 1986, Biran e colaboradores relacionavam concentração sérica de SAA e sobrevida de pacientes com câncer. Nesta pesquisa, a média de sobrevivência dos pacientes em estágio terminal foi significativamente menor naqueles que possuíam concentração maior que 10 μ g/mL de SAA se comparado aqueles com concentração menor que 10 μ g/mL de SAA. Ainda neste estudo, foi constatado que os níveis mais elevados de SAA foram em pacientes com carcinoma metastático se comparado a indivíduos com carcinoma localizado. Howard e seus colaboradores (2003), usando tecnologia proteômica e espectrometria de massa, identificaram SAA como a proteína significativamente mais aumentada em pacientes com câncer de pulmão se comparado a pacientes saudáveis.

Um corpo crescente de dados *in vitro* suportam o conceito do envolvimento da SAA na carcinogênese e neoplasias. O possível papel da SAA na patogênese do tumor é baseado na sua capacidade de induzir quimiotaxia (Su et al., 1999), adesão celular (Badolato et al., 1994), migração (Conolly et al., 2010; Conolly, Veale & Fearon, 2011) e interagir com a matriz extracelular através de MMPs (Preciado-Patt et al., 1996; Paret et al., 2010; Conolly, Veale & Fearon, 2011), seja degradando a matriz (Migita et al., 1998; Conolly et al., 2012), ativando o plasminogênio (Michaeli et al., 2008), alterando a afinidade de diferentes tipos celulares a matriz,

influenciando fatores de crescimento e citocinas. Todos estes fatores podem influenciar a iniciação e o desenvolvimento do tumor (Malle, Sodin-Semrlb & Kovacevica, 2009). Estas inúmeras ações da SAA em células do sistema imune ou em diferentes patologias parece compartilhar similaridades com processos de invasão, migração e proliferação celular em tumores.

É sabido que a família de genes da SAA (SAA1 e SAA2 de fase aguda e SAA4 constitutiva) está aumentada em tumores humanos (Malle, Sodin-Semrl & Kovacevic, 2009). A correlação direta entre as concentrações elevadas de SAA no soro de pacientes com câncer e progressão do tumor (Glojnaric et al. 2001; Howard et al. 2003; Upragarin et al., 2005; Moshkovskii et al. 2007) permitiu eleger SAA como sensora de malignidade e inflamação (Peracaula, Sarrats & Rudd, 2010). Dado interessante sugere que a mutagênese no genoma de células cancerosas pode levar ao aumento de SAA como resultado do aumento da atividade de alguns fatores de transcrição que transativam a expressão de SAA, como NF κ B e STAT3 (Hagihara et al., 2005).

Os estudos que sugeriram alguma relação da SAA com células tumorais mostraram que SAA induz a ativação de plasminogênio em células de câncer de cólon (Michaeli et al., 2008), bem como aumenta a atividade de MMP-9 e a invasão de células de câncer renal (Paret et al., 2010). Paret (2010) também contribuiu sugerindo que concentrações elevadas de SAA no sangue são indicativas de mau prognóstico e agressividade do tumor. Nosso grupo de pesquisa mostrou que SAA é expressa em células A172 e T98G e que SAA exógena foi capaz de afetar proliferação, migração e invasão, bem como induzir moléculas importantes no microambiente do tumor, como: IL-8, NO, ROS e MMP-2 e -9 (Knebel et al., 2013).

Os trabalhos que apontam SAA como biomarcadora ou que mostram expressão aumentada de SAA em tumores não se esgotam (**Quadro 1**). SAA foi sugerida como biomarcadora sérica para hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata (Menschikowski et al., 2013), bem como foi associada com risco de câncer de pulmão (Shiels et al., 2013). Recentemente o gene constitutivo SAA4 foi encontrado em altas concentrações comparado a outras proteínas analisadas na urina de pacientes com câncer de bexiga em fase inicial e, portanto foi sugerido como biomarcadora para detecção do mesmo (Chen et al., 2013). Outro estudo aponta ainda SAA como estimuladora da neovascularização em células endoteliais

vasculares (Cai, Freedman & Witting, 2013), sugerindo uma função angiogênica para SAA.

Quadro 1: Neoplasias em que foram encontradas expressões aumentadas de SAA.

Tipos de câncer	Autores
Nasofaríngeo	Cho et al., 2004; Diamandis, 2004
Ovário	Moshkovskii et al., 2005; Urieli-Shoval et al., 2010
Próstata	Le et al., 2005; Menschikowski et al., 2013
Gástrico	Chan et al., 2007
Neuroblastoma	Sandoval et al., 2007
Pulmão	Liu et al., 2007; Cho et al., 2010; Sung et al., 2011; Bozinovski et al., 2008
Uterino	Cocco et al., 2009; Ren et al., 2014
Melanoma	Findeisen et al., 2009
Endométrio	Cocco et al., 2010
Renal	Paret et al., 2010; Fischer et al., 2012.
Mama	Zhang et al., 2012
Bexiga	Chen et al., 2013
Glioblastoma	Resultados nesta tese.

Apesar de não ser novo encontrarmos estudos que mostram concentrações elevadas de SAA no sangue de pacientes com os mais diversos tipos de câncer, a quantidade de estudos que apontam SAA como produto tumoral tem recebido destaque (Ren et al., 2014). Isto porque inicialmente se pensava que SAA aumentada no sangue fosse oriunda apenas de uma produção hepática, entretanto com o crescente número de estudos mostrando expressão aumentada de SAA em tecidos tumorais, a atenção voltou-se ao entendimento da função da SAA produzida pelo tumor.

Embora muitos dos efeitos conhecidos para SAA estejam associado a um perfil pró-inflamatório, propriedades anti-inflamatórias tem sido descritas. Dados obtidos de pacientes com melanoma mostraram que SAA foi capaz de estimular neutrófilos imunossupressores a produzir IL-10, a qual suprime a imunidade celular (De Santo et al., 2010). SAA também induziu a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 em outros tipos celulares (Song et al., 2009; Cheng et al., 2008; Lee et al., 2006), inibiu o burst oxidativo em neutrófilos (Linke et al., 1991) e a resposta inflamatória em camundongos com pneumonia, reduzindo os níveis de TNF- α e IL-6

(Renckens et al., 2006). Além disso, SAA também tem sido mostrada por induzir efeitos indiretos em células do sistema imune adaptativo (Nguyen et al., 2011).

1.3 MMPs, ROS, câncer e SAA

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas que desempenham inúmeras funções fisiológicas, dentre elas: formação óssea, migração celular, angiogênese e reparo de tecidos (Bharat et al. 2006). Entretanto, em condições patológicas a expressão e atividade de várias MMPs tem se mostrado aumentada, principalmente em doenças inflamatórias e no câncer (Nissinen & Kahari, 2014). As MMPs são classificadas de acordo com a especificidade do substrato e a homologia de domínios em: colagenases, gelatinases, elastases e estromelisinases (Brummer et al., 2002). Elas são sintetizadas na forma de pró-enzimas ou zimógenos e são mantidas em um estado inativo pela interação entre o grupo tiol da cisteína presente no pro-domínio e o íon zinco presente no sítio catalítico (**Figura 4**) (Ra & Parks, 2007) e secretadas ou expostas na superfície celular para serem processadas e ativadas através do rompimento da interação entre o tiol do pró-domínio da MMP e o íon zinco da porção catalítica por oxidação do tiol, ativando o sítio catalítico das mesmas (Fu et al., 2001).

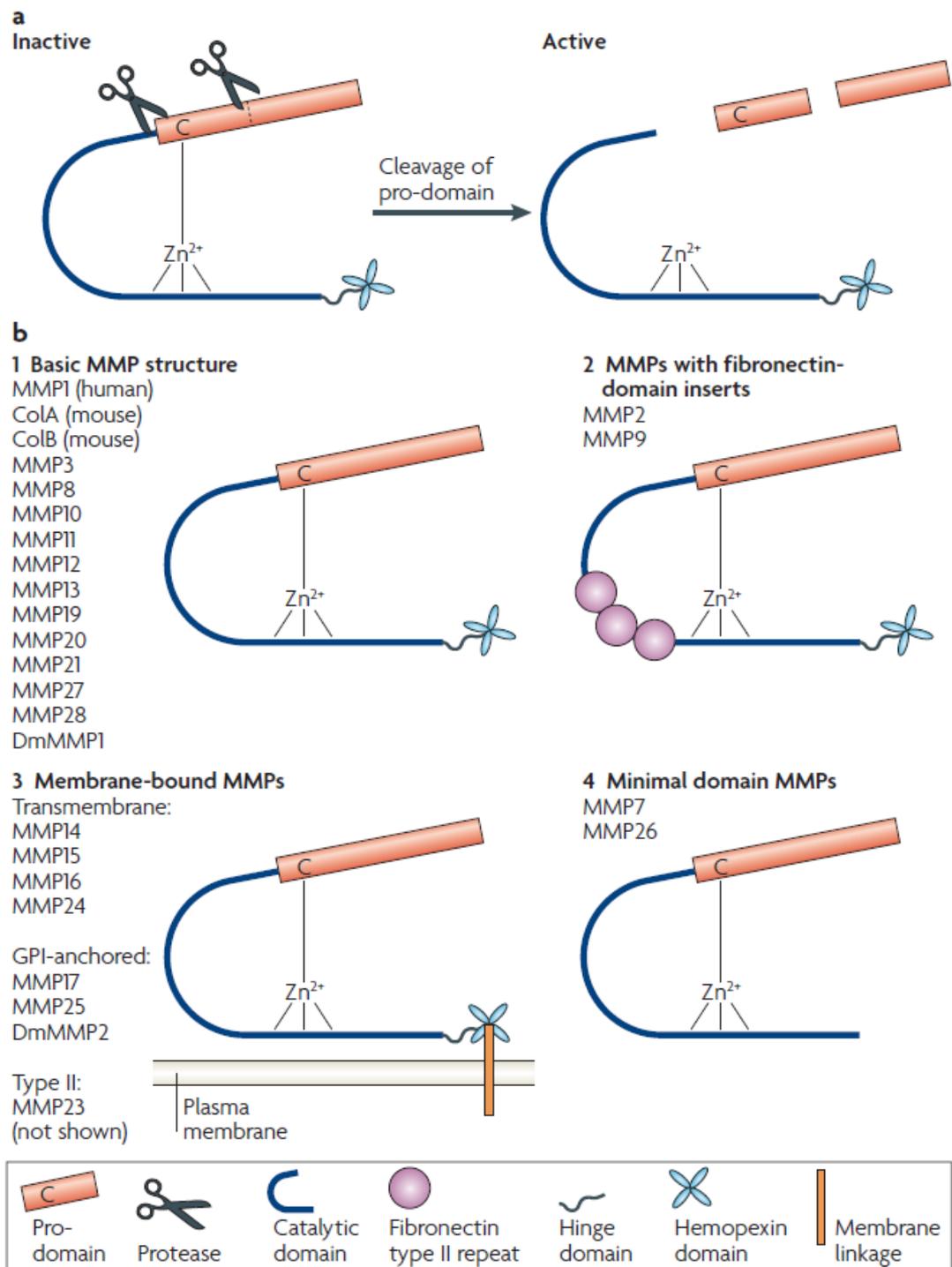


Figura 4: Metaloproteinases de matriz são expressas como pró-proteínas. (A) Um resíduo de cisteína conservado no pró-domínio coordena o íon zinco. MMPs são ativadas pelo rompimento da interação entre o tiol do pró-domínio da MMP e o íon zinco da porção catalítica por oxidação do tiol, ativando o sítio catalítico. (B) Diversidade estrutural das MMPs. Retirado de: Page-McCaw, Ewald & Werb, 2007, *Reviews Molecular Cell Biology*.

As MMPs podem ser reguladas por seus inibidores: α -macroglobulina e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), bem como pela proteína RECK que é conhecida por inibir MMPs-2, -9 e -14 (Oh et al., 2001). Nos vertebrados,

quatro isoformas de TIMPs foram identificadas; TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. A isoforma TIMP-2 liga-se ao zimógeno de MMP-2 (pro-MMP-2), enquanto TIMP-1 forma um complexo específico com pro-MMP-9. TIMP-4 também se liga ao domínio C-terminal da pro-MMP-2 (Brew, Dinakarandian & Nagase, 2000). RECK está presente em diversos tecidos normais, entretanto, sua expressão é diminuída ou reprimida durante a transformação celular, enquanto, a secreção e atividade das MMPs encontram-se aumentadas, contribuindo para o comportamento invasivo do tumor (Takahashi et al., 1998).

MMP-2 e -9 são gelatinases que degradam colágeno tipo IV, o principal componente da MEC de tumores cerebrais. O mecanismo chave na invasão de gliomas consiste na degradação da matriz extracelular, especialmente por MMP-2 e -9 (Rao, 2003; Hanisch & Kettenmann, 2007). Concentrações séricas aumentadas de MMP-2 em pacientes com tumores tem sugerido a mesma como marcador diagnóstico e prognóstico (Blázquez et al., 2008). Concentrações anormais de MMP-9 no soro de pacientes com câncer cerebral mostraram correlação positiva com mau prognóstico (Sbardella et al., 2012). A diminuição de MMP-9 em células de glioma humano resultou em adesão reduzida a MEC, bem como diminuição da migração e invasão (Zhao et al., 2010). *In vivo*, um aumento da expressão e atividade das MMP-2 e -9 foi correlacionado com um aumento do grau de malignidade dos gliomas (Nakagawa et al., 1996).

Os estudos que investigam o envolvimento da SAA no remodelamento da MEC são crescentes. A interação da SAA com MEC através de MMPs não é novo (Preciado-Patt et al., 1996; Migita et al., 1998). O'Hara e seus colaboradores (2004) descreveram que SAA recombinante induziu a secreção de MMP-1 e -3 em sinoviócitos de artrite reumatóide, a qual foi associada à degradação da matriz do tecido sinovial inflamado. Posteriormente, Mullan e seus colaboradores (2006) também verificaram que SAA induziu a expressão de moléculas de adesão, angiogênese e degradação de matriz na artrite reumatóide. Na doença arterial coronariana, o envolvimento da SAA foi sugerido devido a indução de MMP-10 em células endoteliais (Zhao, Zhou & Heng, 2009). Connolly, Veale & Fearon (2011) sugeriram que SAA promove rearranjo do citoesqueleto, interage com a matriz celular e promove migração celular de fibroblastos sinoviais de artrite reumatóide e em seguida identificaram associação entre SAA e clivagem da cartilagem por MMPs em pacientes com artrite inflamatória (Connolly et al., 2012).

Nos últimos anos, a indução de MMPs por SAA começou a ser investigada no câncer. Paret e colaboradores (2010) mostraram que SAA1 recombinante induziu MMP-9 e invasividade em carcinoma de células renais. Sung e seus colaboradores (2011) descreveram que meio condicionado proveniente de células de câncer de pulmão superexpressando SAA1/2, assim como o tratamento com SAA1 sintética aumentou a expressão de MMP-9 em células THP-1. Correlação positiva entre concentrações séricas de MMP-2 e SAA em pacientes com câncer de pulmão permitiu sugerir SAA e MMP-2 como indicadores auxiliares para monitorar a progressão do tumor e mau prognóstico da doença (Kano et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa mostrou que SAA afeta a transcrição de mRNA e a atividade de MMP-2 e -9 em GBM, suportando uma contribuição direta da SAA para o desenvolvimento do tumor, progressão e metástase, dependendo do tipo celular (Knebel et al., 2013) e recentemente mostramos que SAA regula a atividade de MMP-2 e -9 e a invasão de células de trofoblasto de placenta via TLR4 (Sandri et al., 2014).

In vitro, algumas proMMPs podem ser ativadas por espécies reativas de oxigênio (para revisão ver Weinberg & Chandel, 2009). A regulação da expressão e atividades destas enzimas pode ocorrer pela presença de prostaglandinas (Amano et al., 2009), por indução de citocinas e fatores de crescimento como interleucinas, interferons e TNF- α , fatores estes, comuns em processos inflamatórios, bem como em processos tumorais (Yan & Boyd, 2007).

Assim como MMPs, ROS são importantes para a sinalização celular e homeostasia. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas normalmente no meio intracelular como produtos de metabolismo do oxigênio e possuem importante função como sinalizadoras celulares, responsáveis pela ativação de várias vias bioquímicas (para revisão ver Zhou, Shen & Claret, 2013). Entretanto, a produção elevada de ROS resultante de stress oxidativo está associada a eventos deletérios incluindo vias de diferenciação e progressão de neoplasias malignas, apoptose, desenvolvimento de doenças degenerativas e morte celular isquêmica (Martín et al. 2007).

Níveis endógenos de ROS são elevados em células tumorais (Dickinson & Chang, 2011) e podem induzir um conjunto de vias promotoras de tumorigênese e metástase (Weinberg & Chandel, 2009), funcionando como um segundo mensageiro na transdução de sinal intracelular (Chetram, Don-Salu-Hewage & Hinton, 2011). ROS é capaz de inativar o supressor de tumor PTEN e assim promover progressão

do câncer através da ativação da via PI3K/AKT e ERK1/2 (Gao et al., 2004) e ativar o fator de transcrição NF- κ B, o qual induz a transcrição de genes envolvidos em vias regulatórias de crescimento celular (Valko et al. 2006). NF- κ B tem encontrado grande destaque em inúmeros estudos, justamente pelas especulações de sua participação na inflamação associada à carcinogênese (Maeda e Omata, 2008). ROS foram descritas também por ativar MAPK em células (Chiu et al., 2010). Shen e seus colaboradores (2014) demonstraram que produção de ROS aumentada contribuiu para a migração e invasão de células de glioblastoma via ERK e MMP-9.

Nosso grupo de pesquisa descreveu que SAA aumenta ROS em neutrófilos (Hatanaka, Ribeiro & Campa, 2003) e em fibroblastos (Hatanaka et al., 2011), sendo que no último caso foi relacionado ao aumento da proliferação. Outro grupo mostrou que SAA induziu aumento de ROS via FPR2 em neutrófilos (Bjorkman et al., 2008). Portanto, nosso interesse em investigar se SAA induz a produção de ROS em gliomas.

1.4 Implicações das vias de sinalização celular - NF κ B, MAPKs, NO e Ras no Câncer

NF κ B é um fator transcricional chave para a inflamação, regulando a expressão de genes envolvidos com imunidade, inflamação, proliferação e morte celular. Em inúmeros tipos de câncer NF κ B é ativado constitutivamente e pode exercer uma grande quantidade de efeitos pró-tumorigênicos. NF κ B pode ativar citocinas que regulam o sistema imune como TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8, moléculas de adesões e pode controlar processos como proliferação e apoptose e pode ser ativado por uma grande variedade de estímulos como fatores de crescimento e interleucinas e interagir com inúmeras vias de sinalização (para revisão ver Hoesel & Schmid, 2013).

Diversos oncogenes e fatores de crescimento para células tumorais são ativados por NF- κ B (Bhat-Nakshatri, 2002; Mayo, 2001; Pahl, 1999). Estudos mostram que a supressão de NF- κ B em tumores inibe proliferação e induz apoptose (para revisão ver Aggarwal & Shishodia, 2004), assim como observado em GBM (Mut, Amos & Hussaini, 2010).

Ras é uma proteína G de membrana que inicia a transdução de sinal das MAPK. MEKs fosforilam e ativam ERK induzindo a translocação de ERK no núcleo celular. ERK2 ativa muitos alvos nucleares (Bos, 1989). O primeiro alvo citoplasmático de ERK é p90^{RSK} (Janzarik et al., 2007). Este complexo ativado pode fosforilar inúmeros fatores de transcrição como NFκB. Evidências indicam que o eixo Ras-Raf-ERK pode ser um importante alvo terapêutico para gliomas (para revisão ver Lo, 2010).

A cascata Ras-Raf-MEK-ERK está envolvida em muitos aspectos da fisiologia celular e do desenvolvimento de neurônios e da glia (Zsarnovszky and Belcher, 2004). A via ERK1/2 pode ser ativada por fatores de crescimento (Byts et al., 2006; Hsieh et al., 2010; Su et al., 2011), quimiocinas (Bajetto et al., 2001; Barbero et al., 2002), citocinas (Hsieh et al., 2010) e stress oxidativo (Boulos et al., 2007; Liu et al., 2005). Sinalização através de ERK1/2 tem sido correlacionada a expressão de MMP e/ou atividade de astrócitos (Mendes et al., 2007).

Interação com diferentes estímulos externos pode ativar ou inibir a via de sinalização ERK1/2. Além disso, dependendo do tipo celular, as respostas biológicas podem ser distintas para determinados fatores de crescimento, dependendo dos mecanismos de ativação envolvidos (Byts et al., 2006). Diversos estudos têm revelado que dois membros da família das MAPK, dentre eles: JNK e p38 MAPK podem ser correlacionados com apoptose celular (para revisão ver Cheng, Alberts & Li, 2013).

A gênese do tumor cerebral com a excessiva ativação ou inativação de ERK1/2 sugere um mecanismo de balanço antagonista que determina qual via de sinalização é ativada. Diversos estudos têm mostrado que ERK1/2 está envolvida na oncogênese de tumor cerebral humano, mudanças morfológicas e metástases (Dai et al., 2005; Mendes et al., 2007; Tsuneki et al., 2005).

Estudos recentes tem identificado iNOS como um regulador crítico da transformação glial. A função dual e divergente do óxido nítrico na biologia do glioma tem sido constantemente discutida. O óxido nítrico é produzido por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) e existente sob três isoformas de acordo com sua atividade e o tecido que foram primeiramente descritas em: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) ou NOS induzida (iNOS). NO é gerado após a exposição a citocinas. A indução da isoenzima iNOS ocorre quando transdutores ativados e ativadores da transcrição dimerizam e translocam para o

núcleo, onde aumentam a expressão do factor de transcrição, IRF-1, que, por sua vez, liga-se a elementos específicos do DNA na região promotora do gene iNOS para aumentar a expressão do gene iNOS. iNOS é uma enzima solúvel que, ao contrário de eNOS e nNOS não requer concentrações de cálcio intracelular elevadas para ativação (para revisão ver Lam-Himlin et al., 2006).

Indução da izoenzima iNOS tem sido demonstrada em uma variedade de tumores cerebrais humanos, inclusive GBM e expressão de iNOS foi encontrada em inúmeras células gliais em cultura (para revisão ver Lam-Himlin et al., 2006). Um estudo com 40 pacientes diagnosticados com tumores do SNC mostraram expressão de nNOS aumentada em neoplasma gliais de células tumorais e a maioria em tumores de alto grau (Broholm et al., 2003). Evidências de efeitos tumorocidas de NO incluem estudos em células A172 e T98G, demonstrando indução de apoptose (Shinoda and Whittle, 2001).

Embora a função exata de iNOS no câncer não seja clara, atividade tanto de iNOS quanto eNOS têm sido implicadas na progressão e angiogênese de tumores e sua eficácia parece ser dependente de sua atividade, distribuição, concentração e duração de exposição, e a sensibilidade intrínseca das células para NO (Fukumura et al, 2006). Níveis de NO em células tumorais são frequentemente elevados (Fitzpatrick et al., 2008), inclusive em astrocitomas (Hara & Okayasu, 2004), tipo celular este em que o mesmo foi relacionado ao aumento da tumorigênese.

Transfecção de melanoma murino com iNOS diminuiu a razão de crescimento do tumor por induzir apoptose (Xie et al, 1995). Em contraste, superexpressão de iNOS em células de carcinoma de colon resultaram em um tumor mais agressivo e vascularizado comparado a células wt (Jenkins et al., 1995; Cullis et al, 2006). Expressão aumentada de iNOS em câncer de mama e melanoma tem sido associado com mau prognóstico (Loibl et al, 2005; Ekmekcioglu et al, 2006). Estudo recente *in vivo* com camundongos, utilizando antisense para iNOS mostrou que NO oriundo de células de GBM a partir da atividade de iNOS é um modulador chave do crescimento de tumores e angiogênese, reduzindo o crescimento, bem como o desenvolvimento vascular do tumor (Kostourou et al., 2011).

Nosso grupo de pesquisa mostrou que células A172 e T98G produzem NO (Knebel et al., 2013). Entretanto, constitui nosso interesse entender se NO está envolvido na proliferação de células A172 e T98G.

1.5 Glioblastomas Multiformes (GBM) como modelo tumoral

Gliomas apresentam uma incidência anual de 5,26 casos a cada 100.000 pessoas (Dolecek et al., 2012), ou seja mais de 10.000 novos diagnósticos ao ano no Brasil. Estudos de prevalência estimaram que 138.054 pacientes tiveram um diagnóstico de tumor cerebral maligno primário nos Estados Unidos em 2010 (Porter et al., 2010). O câncer cerebral se encontra entre as dez primeiras causas de óbito por neoplasias, embora seja muito raro (Jemal et al., 2006). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa é de que 23.380 novos casos de câncer de cérebro e 14.320 mortes ocorram nos Estados Unidos em 2014.

Gliomas correspondem à maioria dos tumores intracraniais primários, representando 81% dos tumores de cérebro malignos (Dolecek et al., 2012). Glioblastomas são comuns em adultos e correspondem a 45% de todos os gliomas. Caracterizam-se por elevada mitose, necrose, vascularização e invasividade e são os mais refratários ao tratamento (para revisão ver Lo, 2010). Pacientes com GBM sobrevivem por aproximadamente 1 ano após o diagnóstico e menos de 10% sobrevivem além de dois anos (Selznick et al., 2008; Schwartzbaum et al., 2006). Este mau prognóstico se deve em parte a compreensão insuficiente da natureza agressiva destes tumores e a falta de uma terapia eficaz (para revisão ver Lo, 2010). O reaparecimento de um GBM após intervenção cirúrgica para retirada do mesmo é comum devido a sua elevada taxa de invasão local e resistência à terapia (Cordes et al., 2003; Wang et al., 2003).

Os tumores da glia são originados a partir de células da neuroglia transformadas. A neuroglia é formada por quatro tipos de células: os astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e microglia. Os gliomas são classificados em uma escala de I-IV pela OMS de acordo com o grau de malignidade dos mesmos. Considerando o tipo celular, morfologia, proliferação, necrose e características clínicas, os gliomas classificam-se em: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso ou oligodendroglioma (grau II), astrocitoma ou oligodendroglioma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (Maher et al, 2001). GBM são derivados de astrócitos transformados. A denominação multiforme dos glioblastomas se deve à presença de regiões de necrose e hemorragia, núcleos e células pleomórficas e proliferação microvascular, além de inúmeras deleções, amplificações e mutações

de ponto, bem como infiltração difusa das estruturas cerebrais vizinhas (Holland, 2000).

Indivíduos diagnosticados com astrocitomas de menor grau apresentam progressão inevitável à astrocitomas de maior grau (Rao, 2003; Guillemin et al., 2008). Astrocitomas de grau I e II são relativamente raros em adultos, mas são predominantes em crianças. Astrocitoma de grau I é reconhecido clinicamente, geneticamente e histopatologicamente distinto de astrocitomas infiltrativos. Embora astrocitomas de baixo grau sejam geralmente considerados benignos, astrocitomas de grau II podem progredir para astrocitoma maligno de grau III. A Organização mundial de saúde reconhece e classifica astrocitomas de graus II–IV como infiltrante, com aumento da malignidade histopatológica e potencial para a progressão para alto grau (para revisão ver Lo, 2010).

Gliomas são tumores altamente heterogêneos (Theeler et al., 2012) e possuem expressão aberrante de receptores para fatores de crescimento, imprescindíveis para o perfil dos mesmos que apresentam proliferação, migração e invasão aumentada (Demuth & Berens, 2004). As linhagens deste estudo, A172 e T98G (**Figura 5**) representam modelos de carcinoma caracterizados por elevada invasividade. Estas células apresentam diferenças genéticas pontuais: a) A172 apresenta deleção do gene supressor de tumor, PTEN, enquanto T98G apresenta o mesmo selvagem (Zhang, Banik & Ray, 2008); b) A172 apresenta pequena produção de VEGF se comparado a T98G (Yao et al., 2006); c) T98G apresenta maior metilação de ADAM23, a qual tem sido associada a uma redução de mRNA e há uma maior progressão do câncer se comparado a A172 (Costa et al., 2005); d) T98G está associada à maior produção de MMPs, maior crescimento (Silveira Corrêa et al., 2006; Knebel, 2009) e níveis mais baixos de TIMPs se comparado à linhagem A172 (Silveira Corrêa et al., 2006); e) T98G apresenta p53 mutante e A172 selvagem (Van Meier et al., 1994).

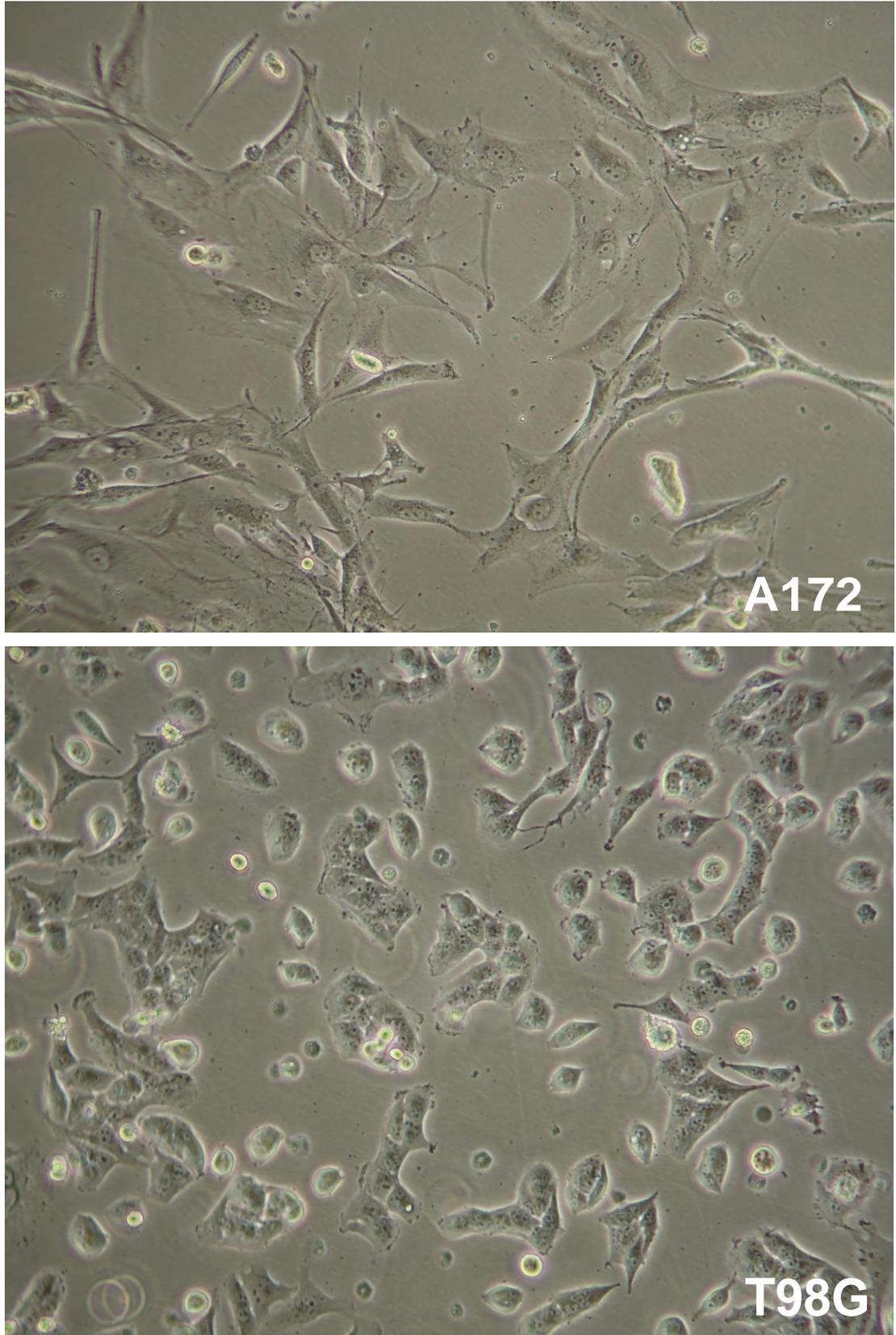


Figura 5: Aspecto morfológico das células A172 e T98G. A linhagem A172 apresenta morfologia semelhante aos prolongamentos neurais, enquanto a linhagem T98G é mais arredondada. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x.

Knockdown de mutante TP53 em células T98G aumentou a sensibilidade das células ao tratamento com Temozolamida (Wang et al., 2014). Células A172 parecem ser mais sensíveis ao tratamento com antineoplásicos quando comparado a células T98G. Células A172 quando tratadas com Temozolamida mostraram aumento da expressão de p53, p21 e p16, sendo esta expressão aumentada correlacionada com 70% de senescência, enquanto células T98G apresentaram apenas 20% de senescência submetidas às mesmas condições de tratamento (Sato et al., 2009). A172 também se mostrou mais sensível ao tratamento por Resveratrol do que células T98G (Lin et al., 2011). Além disso, Cisplatina foi citotóxica para células A172, enquanto células T98G foram resistentes ao tratamento e esta resistência foi associada ao status de p53 (Park et al., 2006).

A proteína 53 (p53) apresenta como função primária controlar o processo de carcinogênese e é essencial para a determinação da resposta de células cancerosas. A função deste tumor suppressor de tumor tem sido avaliada em uma grande quantidade de investigações epidemiológicas, bem como em estudos experimentais. A função de p53 é afetada por mutações ou inativação pós-translacional. Baixa expressão de p53 ou perda da função permite a ativação de muitos genes pró-sobrevivência, tais como a proteína kinase B (PKB/Akt), a qual promove o desenvolvimento de um fenótipo maligno e resistente a apoptose em células cancerosas (Soussi & Wiman, 2007). Expressão baixa de p53 funcional são características de alterações genéticas em diversos tipos de câncer, inclusive em GBM (Berger et al., 2010).

A etiologia dos gliomas não é bem compreendida, entretanto, estudos sugerem que o ambiente cerebral é mais susceptível ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica, devido a grande quantidade de ácidos graxos facilmente oxidados, ao elevado consumo de oxigênio e ao pequeno número de enzimas antioxidantes se comparado a outros tecidos. Estes fatores poderiam induzir danos no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células cerebrais (Barbin et al., 2003). Um número de síndromes hereditárias raras estão associadas com risco aumentado de glioma, incluindo Cowden, Turcot, Li-Fraumeni, neurofibromatose tipo 1 e 2, esclerose tuberosa e schwannomatose familiar (Hottinger & Khakoo, 2007; Gu et al., 2009).

A radiação ionizante é um fator de risco ambiental estabelecido para o desenvolvimento de um glioma. Esta associação foi demonstrada em estudos sobre

crianças que recebem a irradiação craniana para terapia do câncer e em indivíduos expostos a bombas atômicas ou que testam armas nucleares (Bondy et al., 2008).

Outra pesquisa mostra que indivíduos com histórico familiar de GBM na família são mais suscetíveis a desenvolver os mesmos (De Andrade et al., 2001), apesar da história familiar ser raramente observada. Entretanto, quando presente está associado a um aumento de 2 vezes à pré-disposição ao desenvolvimento de um glioma. A exposição ocupacional a produtos como arsênico, mercúrio e petróleo também podem contribuir para o aumento do risco de desenvolver gliomas (Navas et al., 2002). Portanto, compreender os fatores que estimulam o fenótipo agressivo destes tumores será importante para a geração de alvos terapêuticos chaves.

Atualmente, os procedimentos para tratamento de GBM são inicialmente cirurgia seguido de radioterapia e como tratamento de primeira linha, a administração oral do quimioterápico Temozolamida (alquilante de DNA). Esta escolha terapêutica é suportada por um estudo randomizado de fase 3 que mostrou que Temozolamida aumentou a sobrevida dos pacientes de 12 meses para 15 meses (Stupp et al., 2005). No caso de recorrência da doença, Bevacizumabe tem sido bastante utilizado. Este é um anticorpo monoclonal anti-VEGF, inibidor da angiogênese (Gilbert et al., 2013; Wick et al., 2013).

2 Justificativa e Objetivos

Os estudos que correlacionam SAA com câncer são crescentes. SAA foi descrita inicialmente como marcadora da progressão tumoral (Malle, Sodin-Semrlb & Kovacevica, 2009) devido ao aumento sérico de SAA em neoplasias humanas e aumento da produção de SAA por diferentes células tumorais, sendo também correlacionada a um mau prognóstico dos pacientes (Glojnaric et al. 2001; Howard et al. 2003; Upragarin et al., 2005; Moshkovskii et al. 2007). Além disso, SAA é produzida de forma constante e tênue em processos inflamatórios crônicos (Hatanaka et al., 2007) e inflamação crônica contribui para o desenvolvimento e progressão de tumores (Colotta et al., 2009). Paret e seus colaboradores (2010) descreveram que SAA aumenta a atividade de MMP-9 e a invasão de células de câncer renal.

Nosso grupo de pesquisa também tem contribuído para a compreensão da função da SAA em células tumorais (Knebel et al., 2013). Mostramos o efeito direto

da SAA em células de GBM (A172 e T98G), em processos extremamente importantes para a progressão tumoral, como: proliferação, migração e invasão, bem como realizamos análise de moléculas importantes para a viabilização destes processos, como: IL-8, NO, ROS, MMPs e RECK. Nossas investigações também permitiram verificar que glioblastomas são capazes de expressar e produzir a proteína SAA. Os efeitos da SAA sobre o crescimento, migração e invasão dependeram da linhagem e da concentração da proteína e sugerem que SAA seja importante para a biologia dos tumores, exercendo tanto efeitos pró quanto anti-neoplásicos.

As relações entre SAA, inflamação e câncer têm instigado nosso grupo de pesquisa a estudar o efeito da SAA produzida pelo tumor e da SAA exógena (rSAA) em células tumorais, uma vez que os estudos *in vitro* que relacionam SAA e câncer ainda são incipientes.

A partir dos nossos estudos prévios, surgiram novos questionamentos que são os objetivos deste trabalho e que estão listados abaixo:

- 1 - Investigar a capacidade de rSAA induzir a atividade enzimática das MMP-2 e -9;
- 2 - Realizar ensaio clonogênico com a intenção de investigar uma possível contribuição da rSAA no estágio inicial de desenvolvimento de um tumor;
- 3 - Analisar se SAA é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio;
- 4 - Avaliar a possibilidade de hipóxia induzir a transcrição dos diferentes genes da SAA, bem como a produção proteica de SAA;
- 5 - Reconhecer se conhecidos indutores de SAA hepática (IL-6, IL-1 β e TNF- α) também são indutores de SAA em tumores;
- 6 - Avaliar o envolvimento de TLR2, TLR4, RAGE e FPR2 na proliferação, migração e invasão induzida por rSAA, utilizando anticorpos neutralizantes e o antagonista WRW4;
- 7 - Investigar o envolvimento de algumas vias de sinalização relacionadas a proliferação e migração como MAPK, NF κ B, óxido nítrico e Ras;
- 8 - Construir *knockdowns* para SAA através da técnica de sistema lentiviral, a fim de avaliar os efeitos da supressão de SAA na proliferação, migração e invasão;
- 9- Avaliar a possibilidade da SAA ser um biomarcador para gliomas.

Considerando que SAA é um estímulo capaz de sinalizar vias relacionadas à proliferação, migração e invasão em glioblastomas, os objetivos gerais deste estudo são: 1- complementar os estudos prévios; 2- investigar os mecanismos de ação e possíveis receptores na célula tumoral; 3- inter-relacionar a SAA com outras proteínas ou condições relevantes ao processo de progressão tumoral; e, 4- reconhecer uma ação intrácrina e/ou autócrina da SAA na célula tumoral.

3 Materiais e Métodos

3.1 Condições de Cultura e Manutenção das linhagens

A linhagem celular A172 (ATCC # CRL1620) foi doada pela Profa Dra. Mari Cleide Sogayar, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química – USP. A linhagem T98G (ATCC # CRL 1690) foi doada pela Profa Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Ambas linhagens foram originadas de glioblastoma multiforme humano com propriedade aderente e morfologia semelhante a fibroblastos.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle's Medium), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 50UI/mL penicilina e 50µg/mL de estreptomicina, incubadas em garrafas de plástico em estufa a 37°C, e atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade controlada de 98%.

As células foram repicadas sempre que atingiram 70% da densidade de saturação, utilizando tripsina a 0,1% em PBSA (tampão fosfato livre de cálcio e magnésio), contendo 1mL de EDTA, tendo sido a cultura previamente lavada com solução de PBS.

3.2 Kit para determinação da atividade das MMP-2 e -9

Foram plaqueadas 1×10^5 células/well das células A172 e T98G em placa de 24 well. No momento em que as mesmas atingiram 70% de confluência, as células foram sincronizadas por 24 horas com meio DMEM acrescido de 0,1% de albumina sérica bovina e posteriormente, estimuladas com concentrações de 5 e 20µg/mL de

SAA por 48h. O sobrenadante foi coletado em microtubos (1,5 mL) e centrifugados a 2000 rpm por 3 minutos a 4°C e transferido para outro tubo. A atividade enzimática foi quantificada através do kit para determinação de atividade das MMP-2 e MMP-9 (Amersham, GE Healthcare) conforme protocolo do fabricante.

3.3 Ensaio Clonogênico

GBM (3×10^2 células) foram plaqueados em placas de 6 poços em meio DMEM com 10% de SFB. Após a aderência, elas foram lavadas com PBS e mantidas em DMEM contendo 0,5% de SFB. As células foram estimuladas ou não com 5 µg/mL de SAA e incubadas durante 14 dias. A cada três dias, o meio de cultura foi trocado e o estímulo, recolocado. No final do experimento, as células foram lavadas com PBS e coradas com violeta genciana (em glutaraldeído). O número, a intensidade e a área das colônias formadas, foram medidos utilizando o aparelho MS FX-PRO (Carestream Healthy Inc.,USA).

3.4 Ensaio de Hipóxia

Foram plaqueadas 1×10^5 células/well em meio DMEM a 10% de FBS em placa de 6 well. Ao atingir 70% de confluência, as células foram colocadas numa câmara normobárica em uma atmosfera de baixa concentração de oxigênio (1% de O₂, 94% de N₂ e 5% de CO₂) a 37°C em estufa de CO₂ por 6 horas. As amostras controle foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ (normóxia) por 6 horas. Células que sofreram hipóxia e células em normóxia foram utilizadas para quantificação da proteína SAA por ELISA e RNA foi extraído e convertido a cDNA para a avaliação dos padrões de expressão dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 por qRT-PCR.

3.5 Determinação de espécies reativas de oxigênio

Foram plaqueadas 1×10^4 células/mL das células A172 e T98G em placa de 96 well com DMEM a 10% de SFB. Quando as células atingiram 70% de confluência, o DMEM suplementado foi removido e uma solução de PBS com glicose foi adicionada, bem como a lucigenina (10 mM) como descrito por Ailhaud (1982) e

então, as células foram estimuladas com SAA (5,0 e 20µg/mL), prontamente a placa foi introduzida no luminômetro e a quimioluminescência monitorada por 3 horas a 37°C.

3.6 Knockdown dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 nos Glioblastomas pelo sistema lentiviral

Para geração de células de glioma humano com expressão inibida dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 foram utilizados plasmídeos contendo sequências short-hairpin RNA (shRNA) específicas para estes genes. O vetor lentiviral utilizado foi o pLKO e as sequências foram inseridas no mesmo. O sistema utilizado para empacotamento lentiviral foi o Mission shRNA (Sigma, USA).

Inicialmente, os plasmídeos lentivirais contendo a sequência do gene de interesse foram transfectados juntamente com os plasmídeos empacotadores nas células HEK 293T, de acordo com instruções do fabricante. Os plasmídeos lentivirais sem a sequência de interesse ou contendo sequência aleatória de nucleotídeos (scramble) foram utilizados para a geração dos controles. O empacotamento viral gera partículas virais inativas que foram secretadas no meio de cultura das células HEK 293T. As linhagens de glioma humano foram então infectadas com este título viral e os clones transduzidos selecionados com puromicina. A eficiência do silenciamento gênico foi confirmada por qPCR-RT, utilizando primers específicos para SAA1, SAA2 e SAA4. Para quantificação da proteína foi usado kit de ELISA para SAA1/2 e western blot para SAA4.

Foram realizadas análises de especificidade dos clones empregados no silenciamento por Blast utilizando a base de dados do NCBI.

3.7 Expressão Gênica

3.7.1 Extração de RNA Total

O RNA das células de glioma foram extraídos com o kit RNeasy® Mini Kit da Qiagen, conforme protocolo descrito pelo fabricante. Os “pellets” de RNA foram ressuspensos em 30µL de água livre de DNase/RNase, quantificados pelo NanoDrop ND-1000. A pureza e qualidade dos RNAs foram analisadas pela razão

de absorvância 260/280nm. Isto porque ácidos nucléicos possuem pico de absorvância de UV a 260nm e proteínas possuem absorção a 280nm, portanto uma amostra contaminada com proteína demonstra absorção de raios UV nesse comprimento de onda. Neste estudo, a razão de absorvância ficou dentro do esperado, com valores entre 1,8 a 2,1 em pH neutro e estocados à -80°C até a realização da conversão do mesmo à cDNA.

3.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time – PCR)

3.7.2.1 Preparação dos cDNAs

Os cDNAs foram obtidos através do kit High Capacity RNA to-cDNA Master Mix da Applied Biosystems, conforme protocolo descrito pelo fabricante. 1µg das amostras de RNAs foram convertidas a cDNA. Os cDNAs foram armazenados em freezer -20°C e diluídos com água livre de DNase/RNase.

3.7.3 Expressão Gênica

3.7.3.1 Real Time-PCR quantitativo

O ensaio de Real Time PCR foi realizado para quantificarmos a expressão de mRNA dos genes *SAA1*, *SAA2*, *SAA4*, *TLR2*, *TLR4* (seqüência desenhada conforme Blast da NCBI) e *RAGE* (Zurolo et al., 2011) no cDNA de linhagens de gliomas *wild type* e transfectados; *CXCR4*, *CXCR7*, *CD163* e *HIF-1α* (sintetizados por Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) e *SAA1*, *SAA2* e *SAA4* no cDNA das amostras clínicas oriundas de pacientes com glioblastoma multiforme. Os dados quantitativos das linhagens de glioblastoma foram normalizados com *tubulina* (TUB) e os clínicos foram normalizados com *beta-glucoronidase* (GUSB), fosforibosiltransferase guanina hipoxantina (HPRT) e *TATA-box binding protein* (TBP) (sintetizados por Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). As reações foram feitas para um volume final de 12µL, contendo 3µL da mistura de um dos pares de *primers* concentração *Forward* e *Reverse* de cada gene, 3µL de cDNA e 6µL de Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se no **Quadro 2**.

Quadro 2: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

	Forward	Reverse
<i>hSAA1</i>	5'CCTGGGCTGCAGAAGTGATCAGCGA 3'	5'AGTCCTCCGCACCATGGCCAAAGAA 3'
<i>hSAA2</i>	5'CTGGGCCCGCAGAAGTGATCAGCA 3'	5'GAGTCCTCCGCACCATGGCCTGT 3'
<i>hSAA4</i>	5'GTTTCGTTTTTCAAGGAGGCTCTCCAA 3'	5'GGATATCATTATGTCCCAATAGGCTCT3'
<i>hGUSB</i>	5'AAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT3'	5'CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA3'
<i>hHPRT</i>	5'TGAGGATTTGGAAAGGGTGT3'	5'GAGCACACAGAGGGCTACAA3'
<i>hTBP</i>	5'AGGATAAGAGAGCCACGAACCA3'	5'CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT3'
<i>hTubulina</i>	5'TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG3'	5'AGTGCCAGTGCGAACCTTCATC3'
<i>hCXCR4</i>	5'AATCTTCCTGCCACCATCTACT3'	5'CCGTCATGCTTCTCAGTTTCTTC3'
<i>hCXCR7</i>	5'GGTCATTTGATTGCCCGCCT3'	5'GTTGCATGGCCAGCTGATGT3'
<i>hCD163</i>	5'TGGTGCTACTTGAAGACTCTGGAT3'	5'AACAGGCACTGAGAAGTAAGACCA3'
<i>hHIF-1α</i>	5'CATCCAAGAAGCCCTAACGTGT3'	5'CATTTTTTCGCTTCTCTGAGCAT3'
<i>hRAGE</i>	5'AGGACCAGGGAACCTACAGC3'	5'CCTGATCCTCCCACAGAGC3'
<i>hTLR2</i>	5'GCCTCTCCAAGGAAGAATCC3'	5'TCCTGTTGTTGGACAGGTCA3'
<i>hTLR4</i>	5'AAGCCGAAAGGTGATTGTTG3'	5'CTGAGCAGGGTCTTCTCCAC3'

O ensaio de Real Time PCR foi realizado no equipamento 7500 ABI Prism (Applied Biosystems, New Jersey, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para o término do processo de desnaturação e por fim anelamento e alongação dos *primers* a 60°C por 1 minuto.

Para padronização do ensaio de PCR em tempo real, primeiramente foi estipulada qual a melhor diluição de *template* para tais reações com as amostras clínicas de glioblastomas multiformes humanos. Para isso foram feitos “*pools*” de quantidades equivalentes de cada um dos cDNAs obtidos e foram testadas várias diluições deste “*pool*” (puro, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40) com três diferentes concentrações de *primers* (200nM, 400nM e 600nM) de todos genes de interesse. A concentração de 200nM foi a mais específica para os primers do gene SAA1, enquanto a concentração de 400nM foi mais específica para os genes SAA2 e SAA4. Para os normalizadores, 400nM foi utilizado para GUSB, 200nM para HPRT e TBP e por este motivo os experimentos foram realizados nestas concentrações. Adotamos para uso, a diluição de cDNA 1:50 para a determinação dos genes SAA1, SAA2 e SAA4, CXCR4, CXCR7, CD163 e HIF-1 α .

Para as linhagens celulares de glioma humano, A172 e T98G foram feitos “pools” de quantidades equivalentes de cada um dos cDNAs obtidos e foram testadas várias diluições deste “pool” (1:15, 1:30, 1:60, 1:120, 1:240) com três diferentes concentrações de *primers* (400nM, 600nM e 800nM) de todos genes de interesse. A concentração de 400nM foi a mais específica para os primers de SAA1, SAA2 e SAA4, TLR2, TLR4 e RAGE e por este motivo os experimentos foram realizados nesta concentração. Adotamos para uso, a diluição de cDNA 1:15 para as linhagens de glioma normais e knockdown para SAA.

Para análise da expressão gênica através de PCR-RT foi utilizado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta C_t$). Para utilizarmos o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$, foi necessário comparar a eficiência de amplificação dos genes. Os valores de C_T do gene alvo foram subtraídos dos valores de C_T do gene controle. Foi feito um gráfico da diferença contra o logaritmo da diluição de cDNA. Se a inclinação da reta (*slope*) for menor que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, justificando-se assim a utilização deste método de análise de expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001).

3.8 Determinação da proteína SAA

2×10^5 células/mL das linhagens A172 e T98G *wild type* e transfectadas foram cultivadas em placa de 6 well (Corning Incorporated, NY, USA) em meio DMEM 10% SFB, incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após atingir 70% de confluência, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos, lisadas com Tween 0,05%, sonicadas e centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi analisado com o kit Human SAA ELISA (Invitrogen, USA) para quantificação da proteína SAA e posteriormente a concentração de SAA das amostras celulares foram normalizadas pela quantidade de proteína total presente nas mesmas. Para a quantificação de proteína total realizamos Bradford (1976).

As células de GBM submetidas à 6h de hipóxia também foram processadas e quantificadas com kit de ELISA para SAA.

As amostras clínicas foram diluídas 1:100 (controle) e 1:600 (gliomas) e quantificadas por SAA ELISA kit.

3.9 Proliferação Celular por incorporação de [³H]Timidina

Foram plaqueadas 1×10^4 células/mL de células silenciadas e não silenciadas em placas de 96 poços em 200 μ L de DMEM a 10% SFB. Quando as células atingiram 70% de confluência, foram lavadas com PBS, carenciadas com DMEM a 0,5% SFB por 48hs e estimuladas ou não com 5 e 20 μ g/mL de rSAA por 48hs. A adição total de 1 μ L de [³H-metil]-timidina (concentração final de 1 μ Ci/mL) e timidina fria (10^{-7} M) por poço foi realizado 18 horas antes de completar as 48 horas de estímulo com SAA. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x gelado, fixadas com 100 μ L/poço de ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado por 15 minutos e o excesso retirado, lavando com PBS. As células foram lisadas com 20 μ L/poço de NaOH 0,5M (aquecido a 62°C) e incubadas por 20 minutos na estufa. Posteriormente, os papéis filtros (1,0 - 0,5cm) foram introduzidos nos poços da placa por 20 minutos. Os filtros foram lavados com TCA 5%, em seguida com etanol 70% e por último com acetona. Os filtros foram secos em estufa 40°C por 2 horas. Os filtros secos foram colocados em frascos de cintilação (PPO 4g; POPOP 0,1g e tolueno 1L). A contagem de radiação foi feita em aparelho cintilador.

Para os ensaios em que foram utilizados inibidores de TLR2, TLR4 e RAGE, as células foram pré-incubadas por 2 h com os inibidores e posteriormente rSAA foi adicionada.

3.10 Migração celular

Células A172 e T98G (1×10^5 células/well) foram cultivadas em placas de 24 well em 500 μ L de DMEM a 10% de SFB. Após 24hs as células atingiram confluência e uma linha vertical central (ferida) foi aberta com a ponta de uma ponteira de 200 μ L e os debris lavados com PBS para serem removidos. As células foram estimuladas com 20 μ g/mL de rSAA por 24h em meio DMEM a 0,5% SFB, incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. A migração das células na presença de rSAA foi comparada a migração das células controle. Imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x e 2.4 zoom óptico após 24 h de tratamento com rSAA. A quantificação da migração foi realizada com o programa Axio Vision Release 4.8.

Quando inibidores de TLR2, TLR4 e RAGE foram usados, as células foram pré-incubadas por 2 h com os mesmos antes da adição de rSAA.

3.11 Microscopia Imunofluorescente

Células de gliomas (2×10^3 /mL) foram plaqueadas usando NUNC Lab-Tek II Chamber Slide System (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Após 48 h de cultura foram estimuladas com 20 μ g/mL de rSAA em DMEM suplementado com 0,5% de SFB por 24 h. As células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% (pH 7,4) por 10 minutos, seguido de permeabilização por 5 minutos com solução de Triton X-100. As células foram marcadas com faloidina-rodamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e a lâmina foi montada com Vectashield contendo DAPI. Fotos foram adquiridas utilizando o software Nis Elements e microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse 80i, com lente de aumento 400x.

3.12 Invasão celular

Câmaras de Boyden (8 μ m, BD) foram colocadas em poços de placas de 24wells. Polimerizou-se matrigel (BD) diluído 1:10 para um volume de 30 μ L em DMEM sem soro sobre a membrana da câmara. Células A172 e T98G (6×10^4 células) não silenciadas e silenciadas para SAA1/2, SAA1 e SAA4 foram plaqueadas no compartimento interno da câmara em uma suspensão de 200 μ L de DMEM a 0,5% de SFB na presença e ausência de 20 μ g/mL de rSAA. 300 μ L de DMEM a 0,5% de SFB na ausência de SAA foram adicionados no compartimento externo à câmara de Boyden.

Após 48h as células que atravessaram o matrigel foram fixadas com glutaraldeído 5% diluído em PBS, lavadas 3x com água destilada e então coradas com solução de azul de toluidina a 2%. Após nova lavagem com água destilada para retirada do excesso de corante, o compartimento interno da câmara foi limpo com hastes de algodão. As células que invadiram foram contadas sob microscopia de luz. Três experimentos foram realizados em duplicata de poços e todos os campos foram contados.

Quando inibidores de TLR2, TLR4 e RAGE foram usados, os mesmos foram pré-incubados com as células 2 h antes da adição de rSAA.

3.13 Western Blot

Células A172 e T98G foram lisadas com RIPA, quantificadas por Bradford (1976) e 40µg de proteína sujeitas à eletroforese em gel de poliacrilamida (15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) (PAGE). Proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo primário contra as proteínas de interesse: SAA4 (1:800); SAA 1:1000 (ab687); fosfo-Erk1/2 1:1000 (ab17942); MEK1 1:1000 (ab32091), fosfo-MEK1 1:1000 (ab96379); RAGE 1 µg/mL (ab3611); TLR2 1 µg/mL (ab24192); TLR4 1 µg/mL (ab22048); Vinculina 1:400 (V9131-Sigma). A membrana foi então sondada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e as bandas foram visualizadas utilizando ECL (enhanced chemiluminescence – ECL; Amersham, Arlington Heights). Como controle endógeno foi utilizado a proteína Vinculina. As condições para incubação das membranas foram realizadas conforme “*data sheet*” do produto.

3.14 Imunohistoquímica

O procedimento imunohistoquímico para a proteína SAA foi realizado em cortes de 4 µm em lâminas de tecidos incluídos em parafina. Secções de tecido foram inicialmente processadas e submetidas à recuperação antigênica. As lâminas foram bloqueadas por imersão em tampão citrato 10 mM, pH 6,0, e incubadas a 122°C por 3 minutos utilizando Pascal elétrica (BioCare Medical, Walnut Creek, USA). Posteriormente incubadas com anticorpo primário 1:100 em temperatura 16-20°C por 16 horas. A reação foi revelada utilizando kit comercial (Novolink, Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) em temperatura ambiente utilizando diaminobenzidina e hematoxilina de Harris para a coloração nuclear. Como controle positivo foram usados cortes de pulmão. A análise semiquantitativa (percentagem de estruturas marcadas) e qualitativa (intensidade da reação) da expressão da proteína foi realizada por microscopia óptica. A análise foi feita por dois observadores independentes, obedecendo aos seguintes critérios:

Análise semiquantitativa:

- negativo

- + até 25% das estruturas marcadas
- ++ 26 a 50% das estruturas marcadas
- +++ 51 a 75% das estruturas marcadas
- ++++ mais de 75% das estruturas marcadas.

Análise qualitativa da intensidade da marcação:

- + fraco
- ++ moderado
- +++ intenso

4 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média. Análises estatísticas dos resultados obtidos com as linhagens foram realizadas com Graph Pad Prism4 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados através do teste de comparação One-way ANOVA pelo Student–Newman–Keuls quando mais de duas amostras foram analisadas. As diferenças estatísticas nas células *knockdowns* entre amostra estimulada e não estimulada com rSAA foram determinadas pelo *test t de Student*. As correlações clínicas foram realizadas no programa estatístico SPSS. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativamente diferentes.

5 Resultados e Discussão

5.1 SAA em duas linhagens de Glioblastomas

5.1.1 SAA afeta migração celular dos GBM

Em estudos anteriores nosso grupo de pesquisa mostrou que 20 $\mu\text{g/mL}$ de SAA foram capazes de inibir a migração das células A172 e estimular a migração das células T98G (Knebel, 2009). Neste estudo realizamos o ensaio de migração também com a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ de SAA, uma vez que no ensaio de proliferação esta concentração havia induzido uma maior proliferação das células A172 (Knebel, 2009). A realização deste ensaio nos mostrou que tanto as células A172 quanto as células T98G não tiveram a migração afetada por 5 $\mu\text{g/mL}$ de SAA (**Figuras 6A e B**), enquanto a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ de SAA novamente mostrou o efeito dual da SAA nestas células (**Figura 6A e B**). Esta figura integra o artigo científico publicado no jornal *Mediators Inflammation* (Knebel et al., 2013).

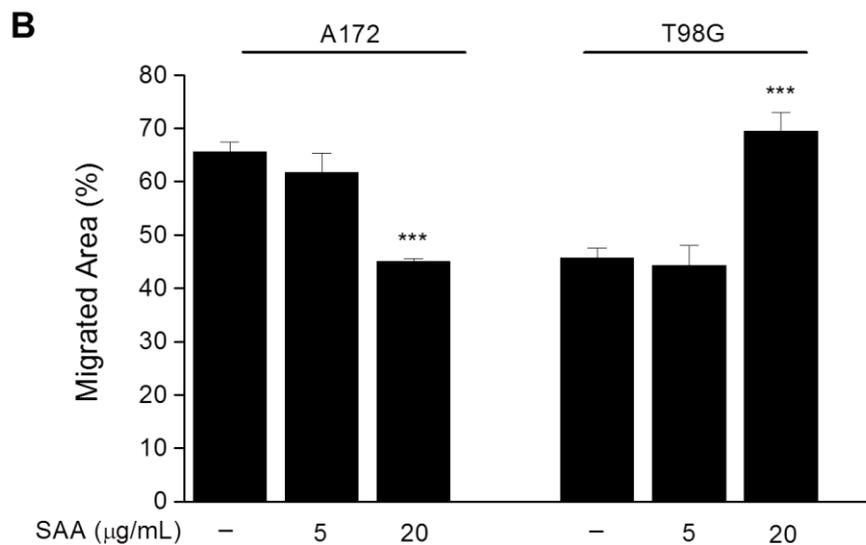
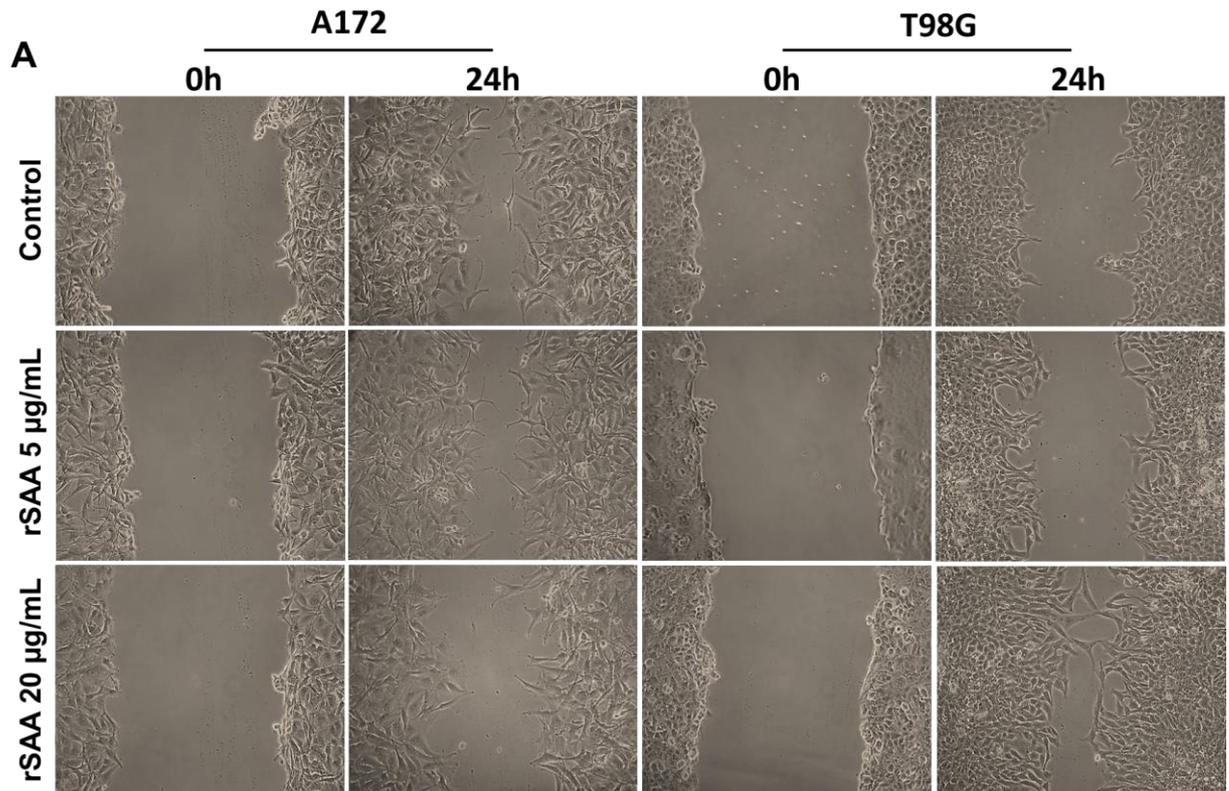


Figura 6: SAA afeta a migração das células de GBM. As linhagens A172 e T98G (1×10^5 células/well) foram mantidas em cultura por 24 h, uma “ferida” central foi aberta após confluência celular. As células foram mantidas em DMEM com 0,5% de SFB na ausência e presença de 5 e 20 µg/mL de SAA. Depois de 24 h a migração foi estimada. As imagens foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de três experimentos independentes. A quantificação da área migrada pelas linhagens A172 e T98G na ausência e presença de SAA foi realizada através do programa Axio Vision Release 4.8. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes *** $p < 0,001$.

5.1.2 SAA afeta a invasão e a atividade de MMP-2 e -9 dos GBM

Assim como consideramos importante realizar o ensaio de migração com 5 µg/mL de rSAA, fizemos também o ensaio de invasão nesta mesma concentração. Entretanto, consideramos pertinente algumas modificações no método, a fim de melhorar o desempenho do ensaio. Dentre as modificações: 1-diluição do matrigel, assim conseguimos utilizar um matrigel mais espesso na câmara de boyden; 2-diminuição do número de células; 3- aumento do tempo de invasão para 48 h e; 4- adição de SAA na porção superior da câmara de boyden, juntamente com as células. Mesmo com a repadronização realizada, os resultados obtidos foram reprodutíveis e comparáveis aos obtidos no mestrado.

O tratamento das células de GBM com 5 µg/mL de SAA diminuiu a invasão das células A172 e aumentou a invasão das células T98G após 48h de tratamento (**Figura 7A e B**). Este mesmo efeito foi observado para a concentração de 20 µg/mL de SAA, conforme já havíamos observado anteriormente (Knebel, 2009). Ainda não sabemos explicar o motivo deste efeito dual, mas as próximas investigações serão realizadas com o intuito de responder estas questões.

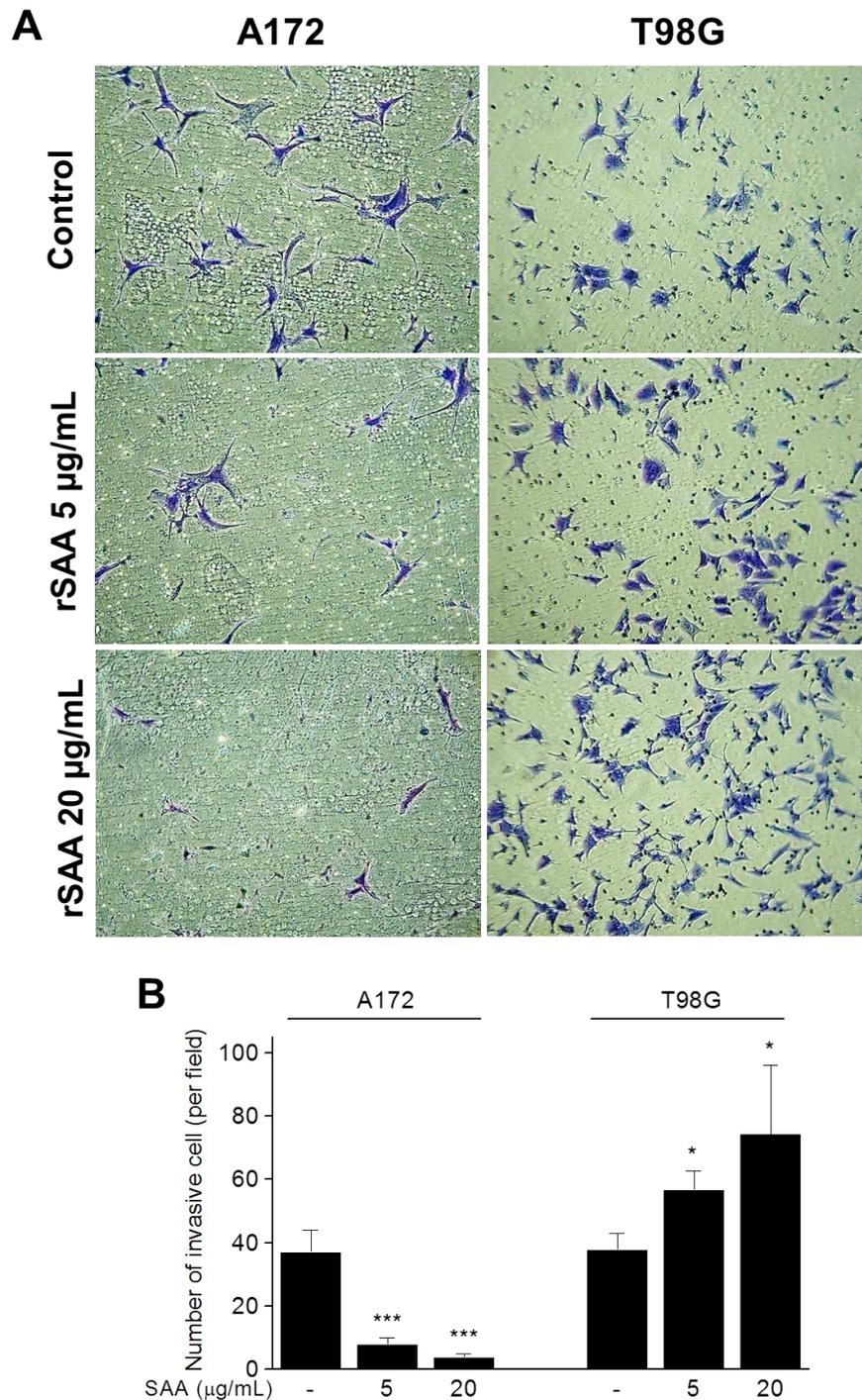


Figura 7: rSAA inibe a invasão de células A172 e aumenta a invasão de células T98G. 6×10^4 células/well foram colocadas em cima do matrigel® em câmara de Boyden com 5 e 20 µg/mL de SAA. Depois de 48 h, as células que invadiram o matrigel® foram fixadas e contadas em microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de três experimentos independentes. O gráfico representa a quantificação do número total de células que invadiram o matrigel® na ausência e presença de SAA. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

Os ensaios de quantificação das MMP-2 e -9 utilizando kit para determinação das formas pro e ativa das MMPs indicam que rSAA afeta a atividade das MMPs em ambas as linhagens. A quantidade de enzima MMP-2 foi maior na linhagem T98G do que na A172, conforme já havia sido observado nos dados de expressão de mRNA das mesmas (Knebel, 2013). As células de fibrosarcoma humano, HT1080, foram utilizadas como controle positivo para MMP-2 e -9 nos ensaios de atividade enzimática (dados não mostrados). Nas células A172, rSAA diminuiu a atividade das enzimas MMP-2 e -9 (**Figura 8**), enquanto na linhagem T98G, a atividade das enzimas MMP-2 e -9 (**Figura 8**) aumentaram na presença da rSAA. Esses resultados reforçam os resultados de experimentos de migração e invasão que já havíamos realizado previamente, nos quais observamos efeito dual da rSAA (**Figuras 6 e 7**).

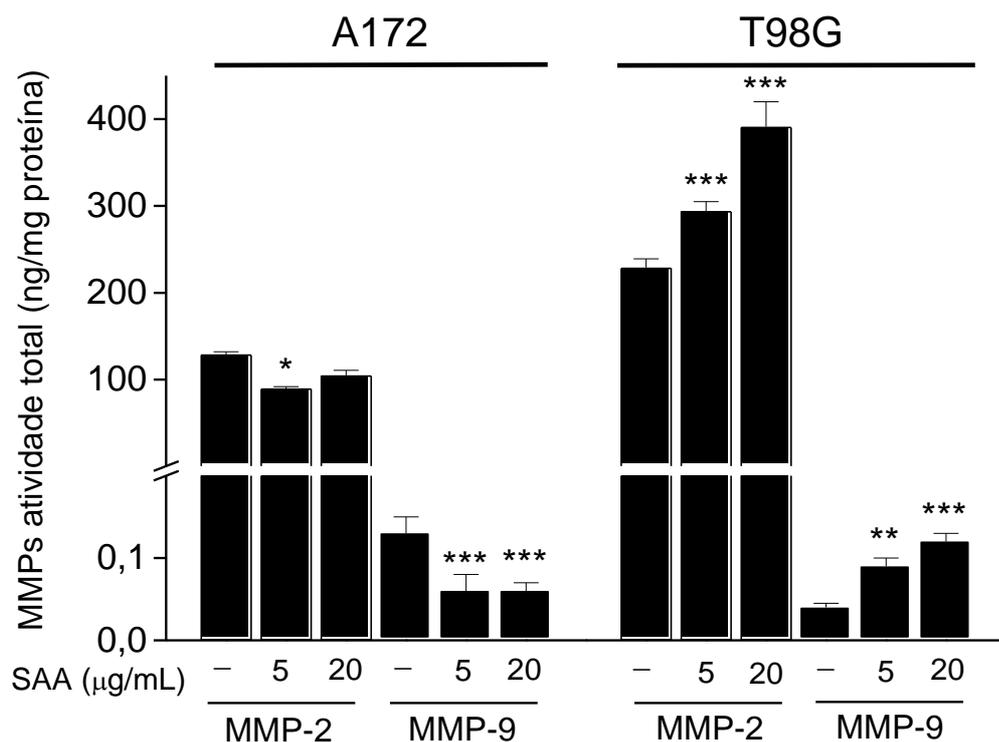


Figura 8: Atividade total de MMP-2 e MMP-9 no sobrenadante das células A172 e T98G estimuladas com rSAA. Foram plaqueadas 10^5 células/well, após 70% de confluência, as células foram sincronizadas com meio DMEM contendo 0,1% de albumina sérica bovina por 24 h e então estimuladas com 5 e 20 µg/mL de SAA por 48 h. O sobrenadante foi recolhido e quantificado com kit específico para MMP-2 e -9. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

De maneira interessante Liu e seus colaboradores (2006) mostraram que em

sarcoma, o status de p53 influenciou a atividade de MMP-9. Neste caso, sarcoma com p53 mutado apresentou maior quantidade de MMP-9 quando comparado a sarcoma com p53 wt. A transfecção de p53 wt em células de sarcoma com p53 mutado diminuiu a atividade de MMP-9, bem como a invasão (Liu et al., 2006). Neste estudo nós também observamos transcrição de MMP-2 e -9 menores em células A172, as quais apresentam p53 wt do que em células T98G que apresentam p53 mutado.

5.2 rSAA (5 µg/mL) não afeta a clonogenicidade dos GBM

O ensaio clonogênico tem sido largamente utilizado para avaliação citotóxica de drogas utilizadas para o tratamento do câncer. Este ensaio permite avaliar a capacidade de uma célula tumoral formar colônias na presença de um estímulo ou não. Neste estudo nós avaliamos se rSAA poderia ou não aumentar ou diminuir o número, a área e a intensidade das colônias dos GBM, com a intenção de investigarmos uma possível contribuição da rSAA no estágio inicial de desenvolvimento de um tumor. Entretanto, não observamos diferença no número (**Figuras 9A e 10A**), intensidade (**Figuras 9B e 10B**) e área das colônias (**Figuras 9C e 10C**) de ambos GBM estimulados ou não com rSAA. Ressalta-se que para este ensaio são usadas baixas densidades celulares, diferente da condição dos ensaios de proliferação por ³[H]-timidina e esta diferença poderia influenciar no tipo de resposta.

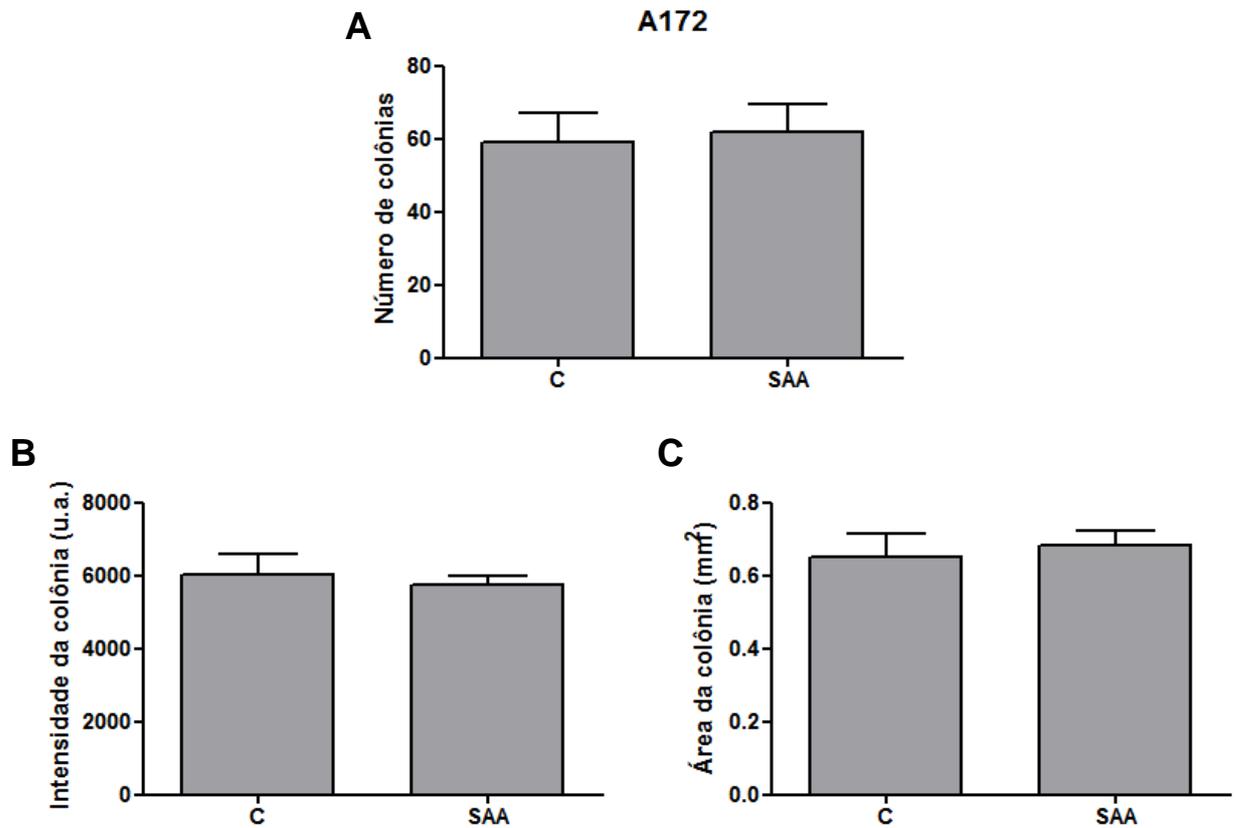


Figura 9: SAA não afeta o número, intensidade e área das colônias de células A172. Ensaio clonogênico foi realizado para avaliação da capacidade de SAA aumentar ou diminuir a formação de colônias dos GBM. Dados representam a média de três experimentos independentes.

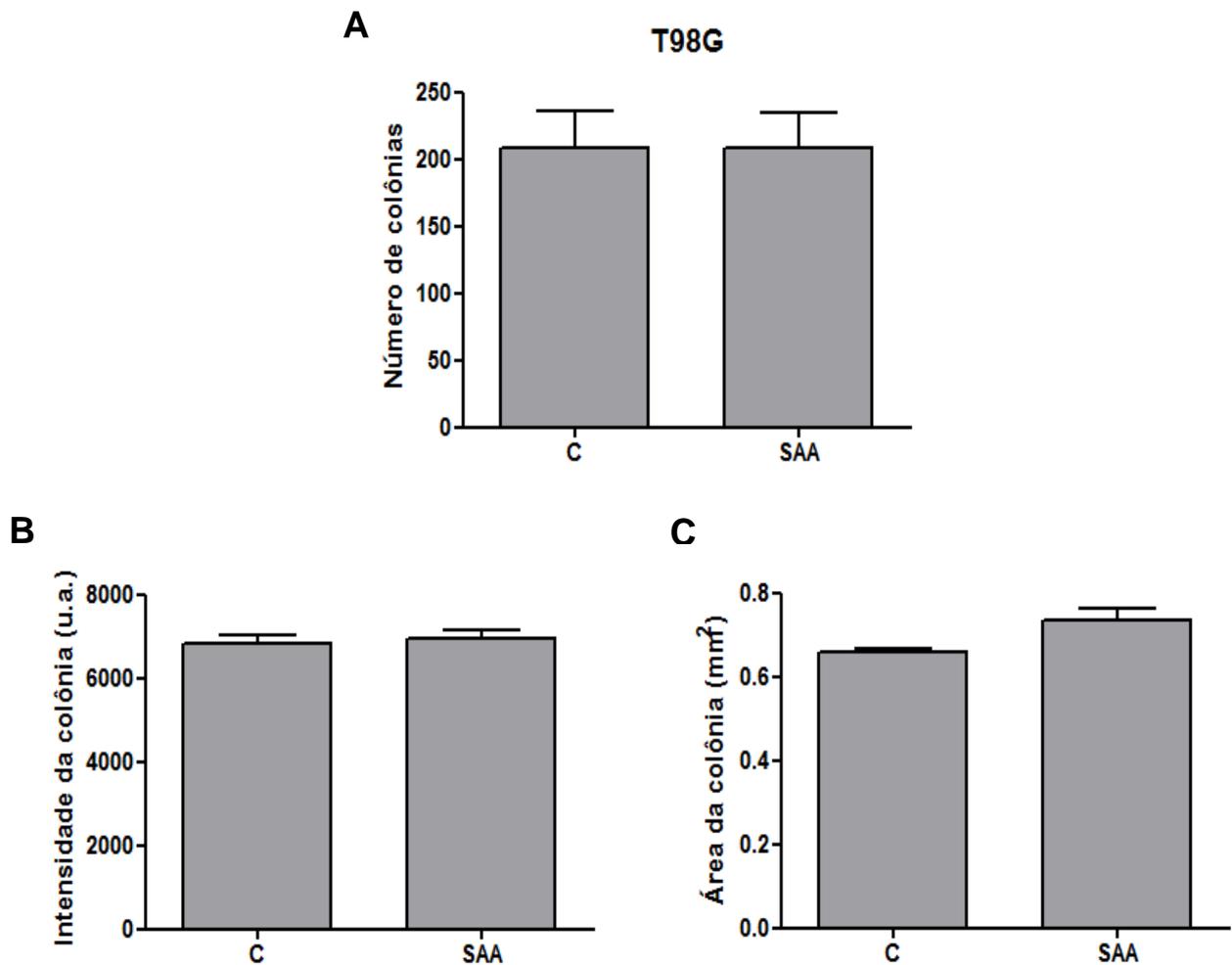


Figura 10: SAA não afeta o número, intensidade e área das colônias de células T98G. Ensaio clonogênico foi realizado para avaliação da capacidade de SAA aumentar ou diminuir a formação de colônias dos GBM. Dados representam a média de três experimentos independentes.

5.3 Produção de ROS pelos gliomas

Espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na modulação de vias de sinalização anti-câncer e pró-câncer (Cook et al., 2004). ROS funciona como um segundo mensageiro na transdução de sinal intracelular, regulando sobrevivência, proliferação e migração em células tumorais (Autréaux & Toledano, 2007). Além disso, nosso grupo de pesquisa descreveu que SAA aumenta ROS em neutrófilos e em fibroblastos imortalizados da linhagem 3T3-L1, sendo que neste último caso está relacionado ao aumento da proliferação (Hatanaka, et al., 2011). Estas evidências justificam o nosso interesse de investigar se SAA induz a produção de ROS nas linhagens de gliomas deste estudo.

A análise de ROS através do ensaio de quimiluminescência amplificada por lucigenina mostrou que SAA induz a produção de ROS nos gliomas (**Figura 11**). É importante mencionar que a produção de ROS pelas células T98G é imediata a adição da SAA, enquanto as células A172 produzem ROS mais tardiamente (**Figura 12**). Também ressaltamos que ambos os gliomas não produzem ROS na ausência da SAA. A produção de ROS foi 2 vezes maior nas células A172 do que nas células T98G quando as mesmas foram estimuladas com 20 $\mu\text{g/mL}$ de SAA (**Figura 11**).

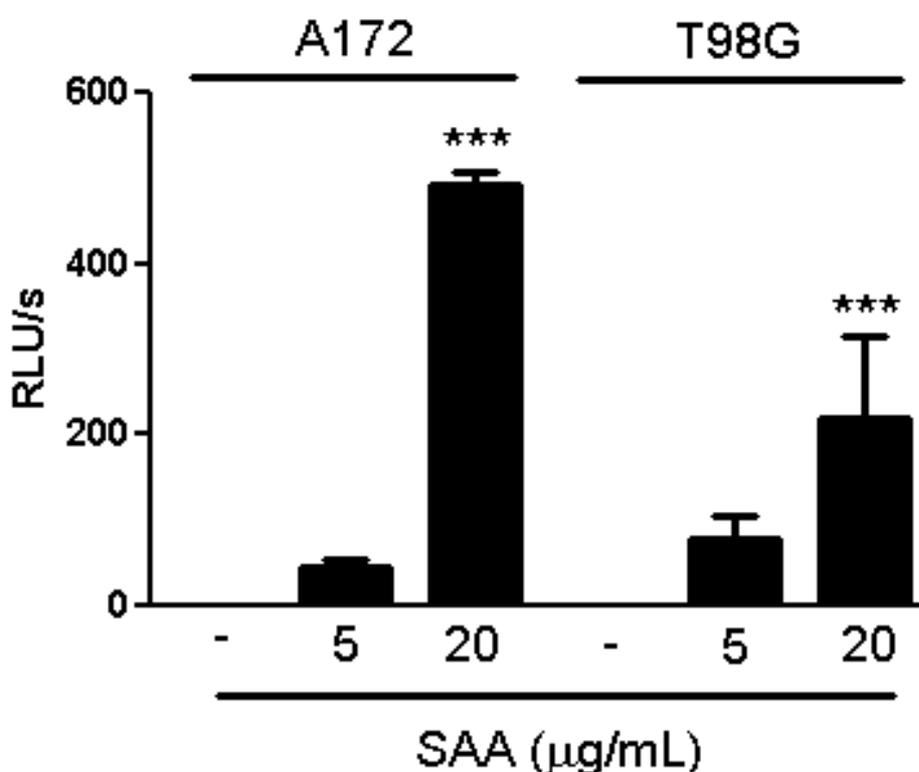


Figura 11: Produção de ROS pelas células A172 e T98G estimuladas com rSAA. $1,0 \times 10^4$ células/mL foram plaqueadas após atingirem 70% de confluência, o DMEM suplementado foi removido e uma solução de PBS com glicose foi adicionada, bem como lucigenina, as células foram estimuladas com rSAA (5,0 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e prontamente analisadas a 37°C no luminômetro por quimiluminescência. Os dados representam a média e desvio padrão das áreas integradas de RLU por 3 horas de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

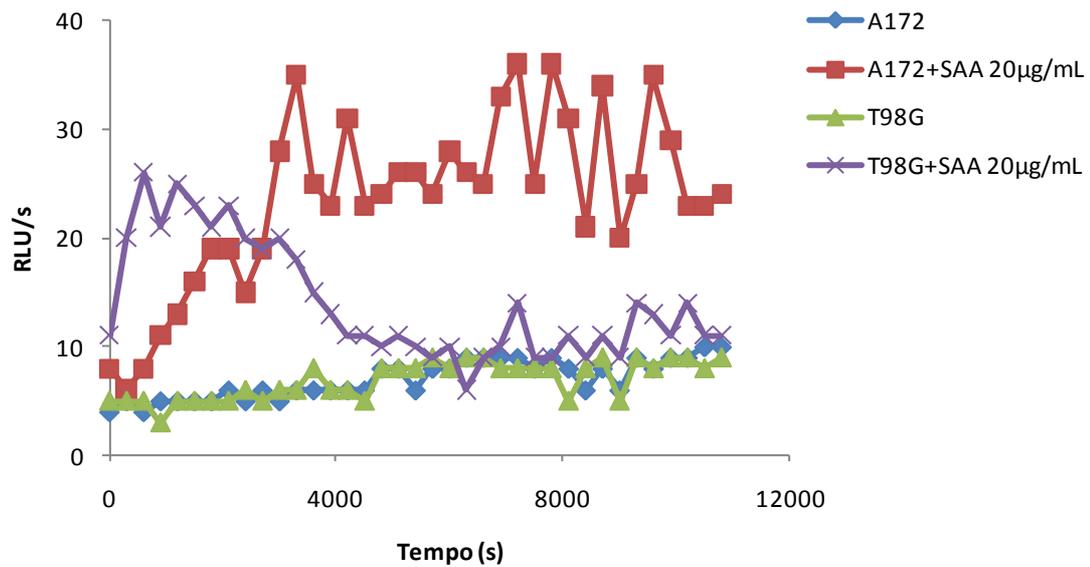


Figura 12: Cinética da produção de ROS pelas células A172 e T98G na presença e ausência de rSAA. As células foram analisadas a 37°C no luminômetro por quimiluminescência. Dados são representativos de três experimentos independentes.

5.4 Hipóxia de 6 horas não altera a produção de SAA nos GBM

Hipóxia em glioblastomas multiformes é muito frequente (Kaur et al., 2005) e tem merecido importante atenção pela influência da mesma no crescimento tumoral (Subarsky & Hill). A fim de investigarmos uma possível indução na transcrição e produção da SAA que poderia impactar no crescimento do tumor realizamos o ensaio de hipóxia. Entretanto, a análise por qRT-PCR mostrou que células A172 e T98G submetidas a hipóxia de 6h apresentaram pequenas alterações na transcrição dos diferentes genes da SAA (**Figura 13**), entretanto não foram observadas alterações na produção da proteína SAA (**Figura 14**).

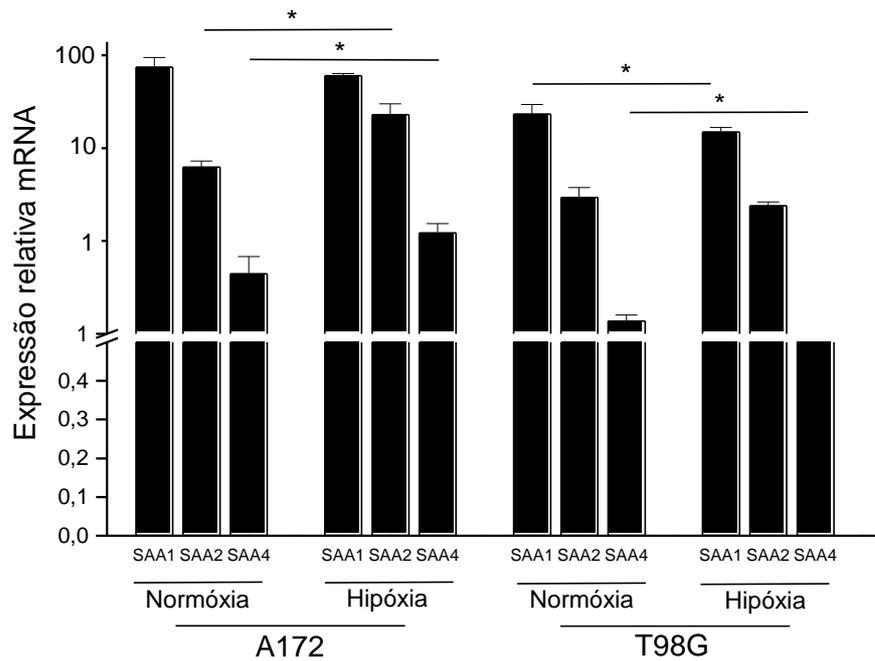


Figura 13: Transcrição de SAA nos GBM submetidos a hipóxia de 6h. qRT-PCR foi realizado para quantificar transcrição de mRNA de SAA1, SAA2 e SAA4 em células sob condição de normóxia e hipóxia de 6 h. A transcrição dos diferentes genes da SAA não foi alterada pela condição de hipóxia. Tubulina foi utilizada para normalização. Dados representam a média de três experimentos independentes.

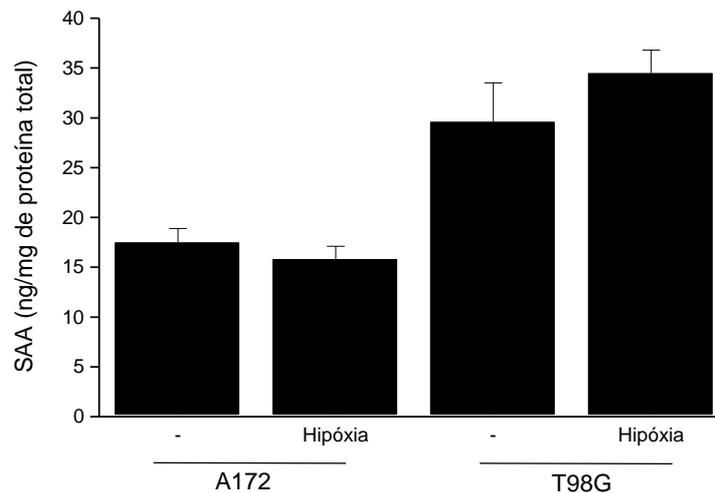


Figura 14: Hipóxia de 6 h não altera a produção da proteína SAA. Quantificação da proteína SAA foi realizada por ELISA. Dados representam a média de três experimentos independentes.

5.5 Indutores hepáticos clássicos da SAA também induzem expressão extra hepática de mRNA dos diferentes genes da SAA

O aumento da expressão e produção das proteínas SAA1 e SAA2 por indutores como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 no fígado durante a resposta de fase aguda é um evento primário conhecido (Steel & Whitehead, 1994). Entretanto, posteriormente, estudos mostraram indução dos genes SAA1 e SAA2 por IL-6, IL-1 β e TNF- α em linhagens celulares de hepatoma e em células epiteliais (Hagihara et al., 2005; Thorn, Lu & Whitehead, 2004). Nosso grupo de pesquisa tem interesse em investigar se estes indutores hepáticos são capazes de induzir em gliomas os diferentes genes da SAA, uma vez que é sabido que tumores são acompanhados de inflamação crônica e que por este motivo são capazes de sintetizar citocinas pró-inflamatórias que podem induzir a produção *in situ* da SAA. Nós já mostramos que IFN- γ é capaz de induzir a expressão de SAA (Knebel, 2009). Neste estudo nós investigamos o efeito direto das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α na indução dos genes da SAA por qRT-PCR.

Para observarmos a melhor condição de ativação dos genes da SAA nos gliomas, analisamos os mesmos ao longo de três tempos (12h, 24h e 48h) após a estimulação com IL-6, IL-1 β e TNF- α . O ensaio por qRT-PCR revelou que na linhagem A172, a transcrição de mRNA do gene SAA1 foi induzida ao longo do tempo apenas pelo estímulo de TNF- α (**Figura 15**). As demais citocinas testadas, não foram capazes de induzir SAA1 (**Figura 15**).

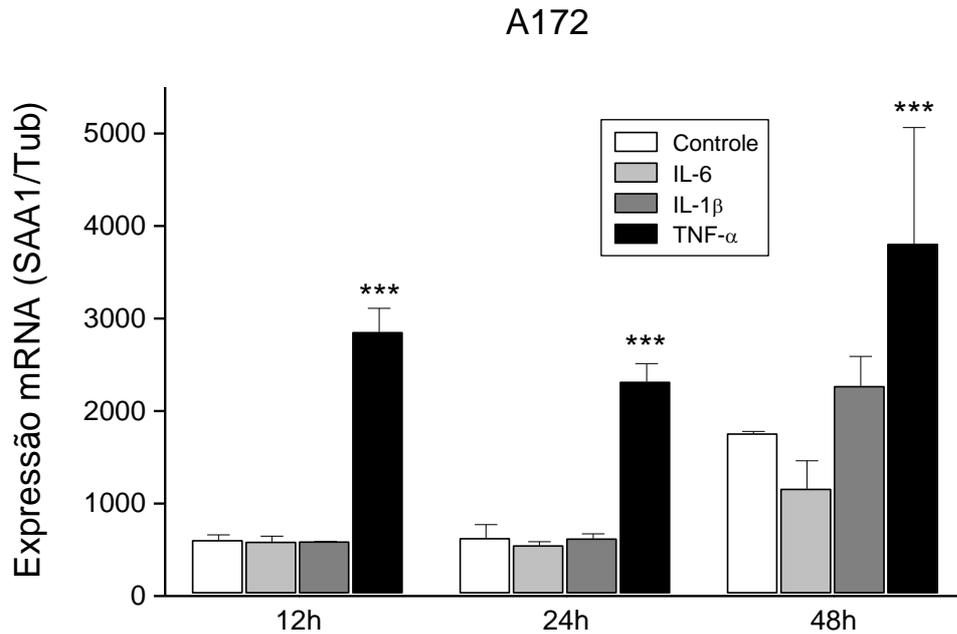


Figura 15: *TNF- α* induziu transcrição de mRNA de SAA1 nas células A172. RT-PCR foi realizado para quantificar transcrição de mRNA do gene SAA1 nas células A172 estimuladas por diferentes citocinas. Os resultados indicam que o gene SAA1 pode ser induzido apenas por *TNF- α* ao longo dos tempos testados, enquanto IL-6 e IL-1 β não modificam esta transcrição. Dados representam a média de três experimentos diferentes. *** $p < 0.001$ vs controle.

Apesar da transcrição de mRNA do gene SAA2 nas células A172 também ter sido induzida por *TNF- α* nos dois primeiros tempos testados, a citocina IL-1 β se destacou pelo aumento de transcrição da SAA2 nas células A172 já em 12h e 24h (**Figura 16**). Entretanto, a maior indução de transcrição de mRNA da SAA2 foi observada com 48h de tratamento (**Figura 16**). Padrão de resposta semelhante ao observado para o gene SAA2 foi verificado para o gene constitutivo SAA4 (**Figura 17**).

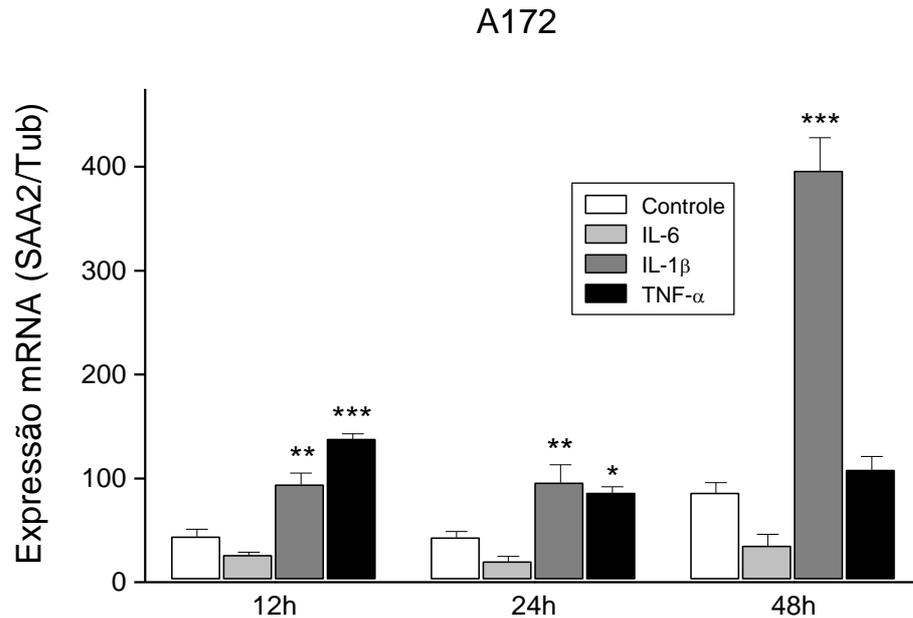


Figura 16: *TNF- α* e *IL-1 β* induziram a transcrição de mRNA do gene *SAA2* nas células *A172*. RT-PCR foi realizado para quantificar transcrição de mRNA do gene *SAA2* nas células *A172* estimuladas por diferentes citocinas pró-inflamatórias. Os resultados indicam que o gene *SAA2* pode ser induzido por *TNF- α* e *IL-1 β* em 12h e 24h, entretanto, *IL-1 β* induz intensamente transcrição de mRNA do gene *SAA2* em 48h. Dados representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

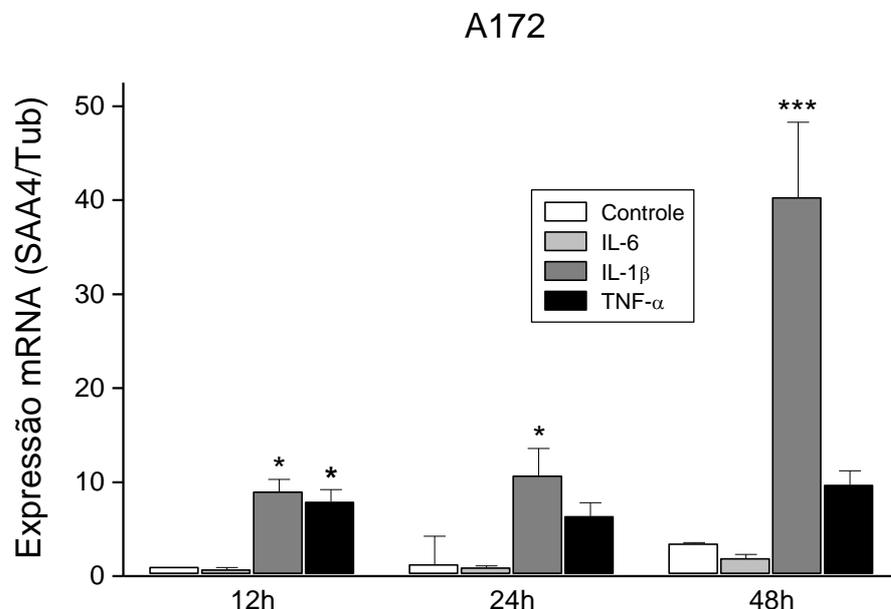


Figura 17: *TNF- α* e *IL-1 β* induziram a transcrição de mRNA do gene *SAA4* nas células *A172*. RT-PCR foi realizado para quantificar transcrição de mRNA do gene *SAA4* nas células *A172* estimuladas por *IL-6*, *IL-1 β* e *TNF- α* . Os resultados indicam que o gene *SAA4* pode ser induzido por *TNF- α* e *IL-1 β* em 12h e 24h, entretanto, *IL-1 β* induz intensamente

transcrição de mRNA de SAA4 em 48h. Dados representam a média de três experimentos diferentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Quanto a linhagem T98G, a transcrição de mRNA do gene SAA1 foi induzido por IL-6 e TNF- α já em 12h de tratamento, entretanto, a indução maior de SAA1 ocorreu em 24h de tratamento com IL-1 β . Ainda com 24h de tratamento, TNF- α continuou induzindo SAA1. Em 48h de tratamento das células T98G com IL-1 β , o gene SAA1 continuou a ser induzido por IL-1 β ainda que em menor intensidade que nos tempos iniciais testados (**Figura 18**). O gene SAA2 das células T98G responde às três citocinas testadas com 12 h e 24 h de tratamento, sendo que em 48 h a indução de mRNA do gene SAA2 foi observada apenas para IL-1 β e TNF- α (**Figura 19**).

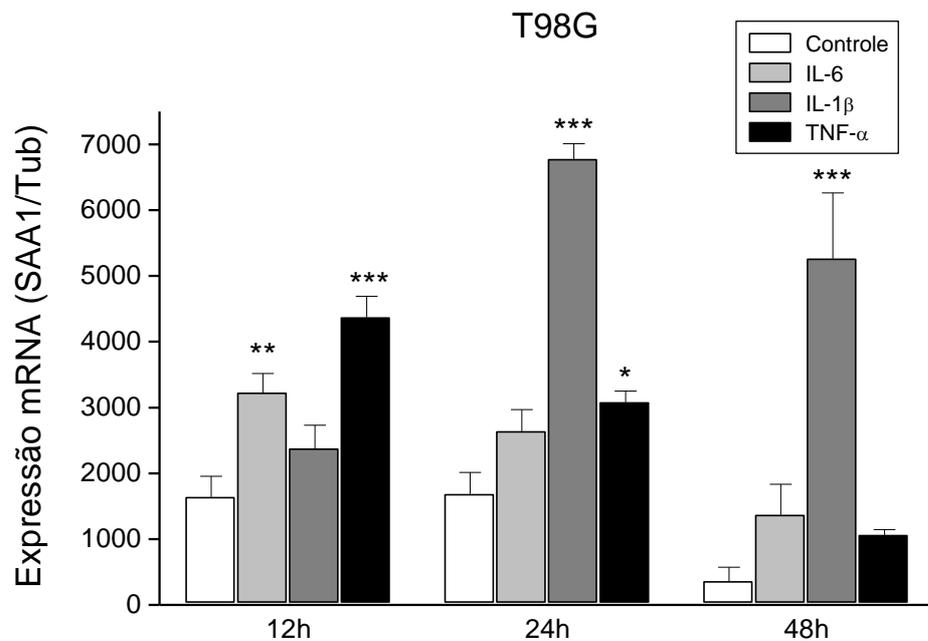


Figura 18: IL-6, IL-1 β e TNF- α induziram a transcrição de mRNA do gene SAA1 nas células T98G. RT-PCR foi realizado para quantificar expressão de mRNA do gene SAA1 nas células T98G estimuladas por citocinas pró-inflamatórias. Os resultados indicam que o gene SAA1 pode ser induzido por IL-6 e TNF- α já em 12h de tratamento, enquanto IL-1 β aumentou a transcrição da SAA1 intensamente em 24h de tratamento. Dados representam a média de três experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

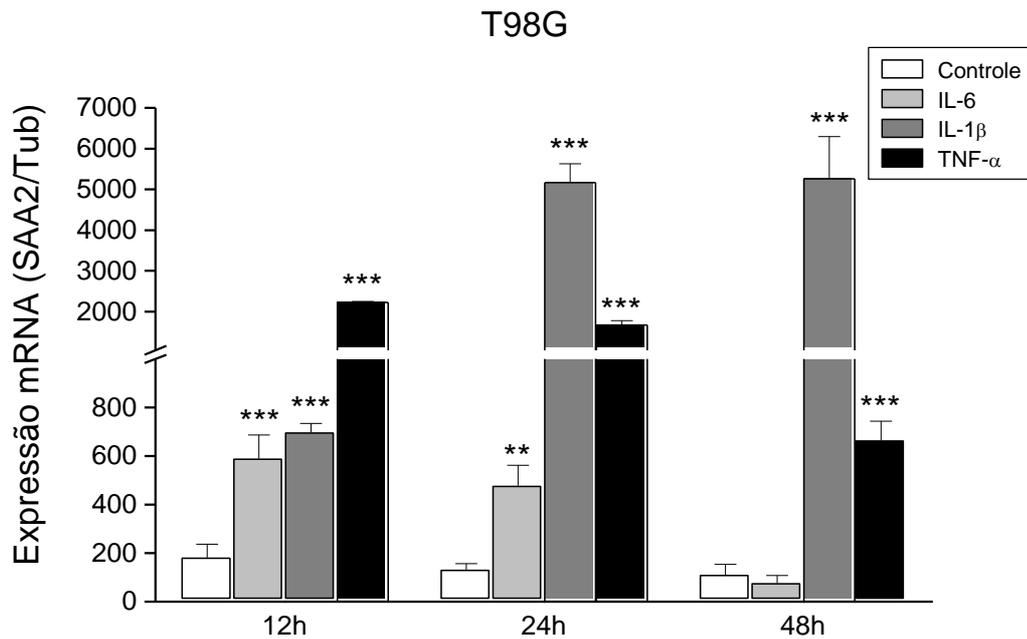


Figura 19: IL-6, IL-1 β e TNF- α induziram a transcrição de mRNA do gene SAA2 nas células T98G. RT-PCR foi realizado para quantificar expressão de mRNA do gene SAA2 nas células T98G estimuladas por citocinas pró-inflamatórias. Os resultados indicam que o gene SAA2 pode ser induzido por IL-6, IL-1 β e TNF- α em 12h e 24h de tratamento e IL-1 β e TNF- α em 48h. É importante ressaltar que IL-1 β promoveu uma maior indução da transcrição de SAA2, sendo a quantidade equivalente em 24h e 48h de tratamento. Dados representam a média de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

A transcrição de mRNA do gene SAA4 nas células T98G também foi induzida de maneira significativa já em 12h pelas citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α (**Figura 20**). Em 24h, a transcrição de SAA4 continuou a ser induzida por IL-6 e IL-1 β e em 48h apenas IL-1 β continua induzindo SAA4 ainda que em menor intensidade que nos demais tempos testados.

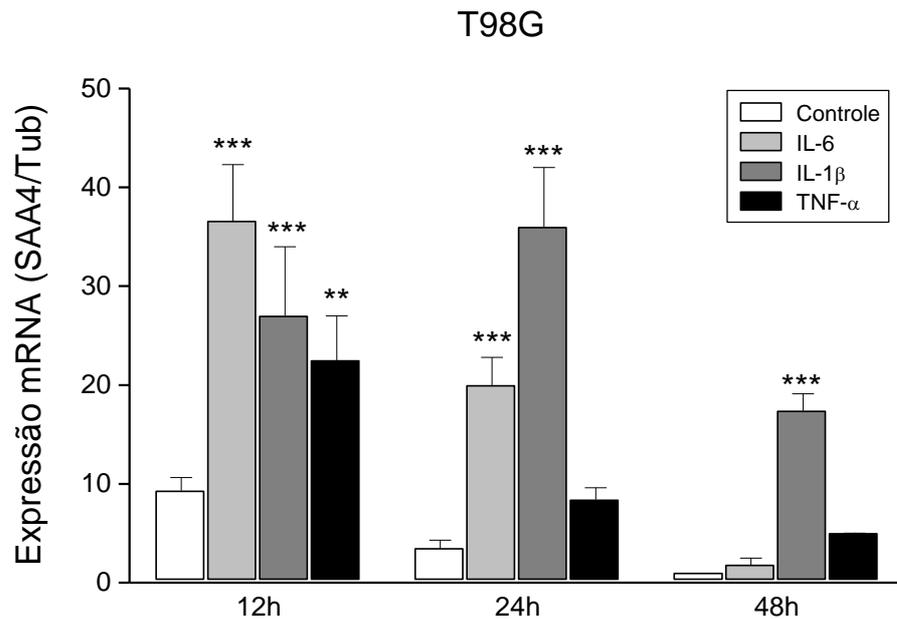


Figura 20: *IL-6, IL-1β e TNF-α induziram a transcrição de mRNA do gene SAA4 nas células T98G. RT-PCR foi realizado para quantificar transcrição de mRNA do gene SAA4 nas células T98G estimuladas por citocinas pró-inflamatórias. Os resultados indicam que o gene SAA4 pode ser induzido por IL-6, IL-1β e TNF-α em 12h de tratamento e IL-6 e IL-1β em 24h. A única citocina capaz de induzir SAA4 em 48h foi IL-1β. Dados representam a média de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.*

Estudos apontam evidências que suportam o envolvimento de citocinas na iniciação, crescimento, invasão e metástase do tumor (Smyth et al., 2004). TNF- α é uma citocina pleiotrópica que participa da regulação de muitos processos fisiológicos, incluindo a resposta imune, proliferação celular, diferenciação e apoptose (Aggarwal & Natarajan, 1996).

TNF- α pode ser produzido por células tumorais e agir como um fator de crescimento autócrino, dotado de atividades promotoras, dentre elas: ativa vias relacionadas a sobrevivência de células tumorais como Ras e c-MYC e, promove angiogênese e metástase, induz outras citocinas, fatores angiogênicos, promove remodelamento do tumor ao estimular a atividade de fibroblastos, induz motilidade e invasão do tumor via indução das MMPs (para revisão ver Smyth et al., 2004; Bharat et al., 2006). É interessante destacar que neste estudo foi possível observar que SAA foi induzida por TNF- α , entretanto, SAA também é capaz de induzir TNF- α e IL-1 β em neutrófilos (Furlaneto & Campa, 2000). Esta reciprocidade de respostas pode

sugerir a existência de retroalimentação positiva entre SAA e TNF- α e entre SAA e IL-1 β em tumores.

As citocinas IL-1 β e TNF- α são definidas como citocinas de alarme por serem secretadas por macrófagos, a fim de iniciar a resposta inflamatória. Elas também podem ser secretadas por células estromais com a finalidade de promover proliferação de células pré-malignantes, bem como induzir moléculas de adesão e regular a invasão do tumor (para revisão ver Smyth et al., 2004). A citocina IL-6 desenvolve ações pró e anti-inflamatórias. O seu perfil pró promove crescimento e inibe a apoptose, sendo capaz de proteger células normais e pré-malignantes (Colotta et al., 2009). Níveis séricos aumentados de IL-6 têm sido associados com baixo prognóstico em pacientes com diferentes tipos de câncer (para revisão ver Martín et al., 1999; Hong et al., 2007).

Citocinas produzidas pelas próprias células tumorais podem promover ações autócrinas e/ou intrácrinas no tumor, induzindo diferentes genes, como a SAA. Por sua vez a SAA induz a síntese de diversas citocinas não somente pela célula tumoral, mas também por células do sistema imune, por exemplo, IL-1 β e IL-6, que da mesma forma que a SAA apresentam propriedades quimioatraentes para neutrófilos e monócitos (Eklund et al., 2012), sugerindo a existência de múltiplos mecanismos de retroalimentação e ativação para produção de IL-1 β , IL-6 e SAA.

Nosso grupo mostrou que neutrófilos quando estimulados com SAA induzem a produção de TNF- α , IL-8 e IL-1 β (Furlaneto & Campa, 2000). Nguyen e seus colaboradores (2014) sugeriram que no sítio da inflamação, SAA pode induzir monócitos a apresentar um fenótipo semelhante às células dendríticas imaturas, as quais passam a secretar uma grande quantidade de IL-1 β e IL-6, induzindo a proliferação de células Treg via ativação de ERK e Akt e sem comprometer a capacidade supressiva das células Treg.

Nossos resultados sugerem que tanto na linhagem A172, quanto na linhagem T98G, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α mostraram ser mais eficientes que IL-6 como indutores dos diferentes genes da SAA. IL-6 foi capaz de induzir a transcrição dos diferentes genes da SAA apenas na linhagem T98G com 12h e 24h de tratamento, não sendo capaz de induzir nenhum dos genes da SAA em células A172. Neste estudo nós não realizamos tratamento sinérgico das diferentes citocinas nas células, pois observamos induções significativas utilizando as citocinas

sozinhas. Entretanto, estudos realizados por Uhlar & Whitehead (1999) mostraram que o tratamento sinérgico e ordenado de IL-1 β seguido de IL-6 promoveu uma maior ativação do promotor de SAA. De maneira inédita mostramos que a transcrição de SAA4 em células A172 foi induzida pelas citocinas IL-1 β e TNF- α , enquanto em células T98G todas as citocinas foram capazes de induzir a transcrição de SAA4.

5.6 GBM expressam TLR-2,TLR4 e RAGE

Os receptores TLR-2, -4 e RAGE são ligantes conhecidos para SAA (Cheng et al., 2008; He et al., 2009; Lakota et al., 2013; O'Reilly et al., 2014; Sandri et al., 2008; Cai et al., 2007; Okamoto et al., 2008). Entretanto, desconhecemos a expressão dos mesmos nas células de gliomas deste estudo, com exceção da linhagem A172 em que um estudo mostra expressão de TLR4 (Tewari et al., 2012; Gupta et al., 2013) e em T98G, na qual já foi descrita expressão de RAGE (Bassi et al., 2008). O ensaio de qRT-PCR permitiu verificarmos que a linhagem A172 apresentou aproximadamente 3 vezes mais transcrição de mRNA de TLR-4 do que a linhagem T98G, enquanto A172 apresentou aproximadamente 2 vezes mais expressão de mRNA de RAGE se comparado a T98G (**Figura 21**). Entretanto, ensaio de western blot permitiu observar que a quantidade de proteína TLR-4 e RAGE foram similares em ambos GBM, enquanto de TLR-2 foi maior nas células A172 do que na T98G (**Figura 22**).

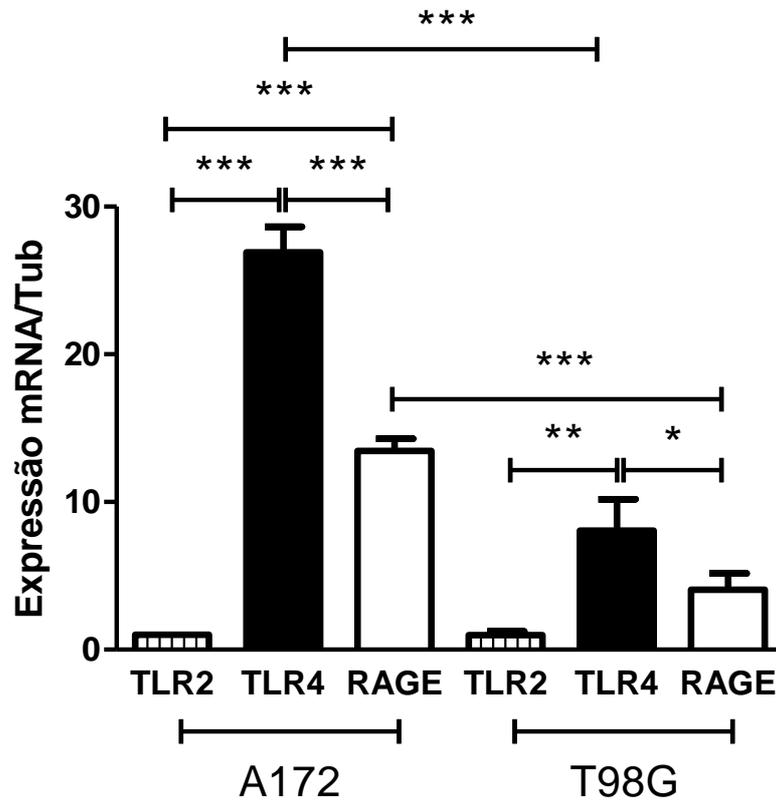


Figura 21: Transcrição de mRNA dos receptores TLR-2, TLR-4 e RAGE nos GBM. RT-PCR foi realizado para quantificação da transcrição de mRNA dos receptores TLR-2, TLR-4 e RAGE nos GBM. As expressões de TLR-4 e RAGE foram maiores nas células A172 do que nas células T98G, enquanto TLR-2 apresentou transcrições similares em ambos gliomas. Dados representam a média de três experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$ vs controle.

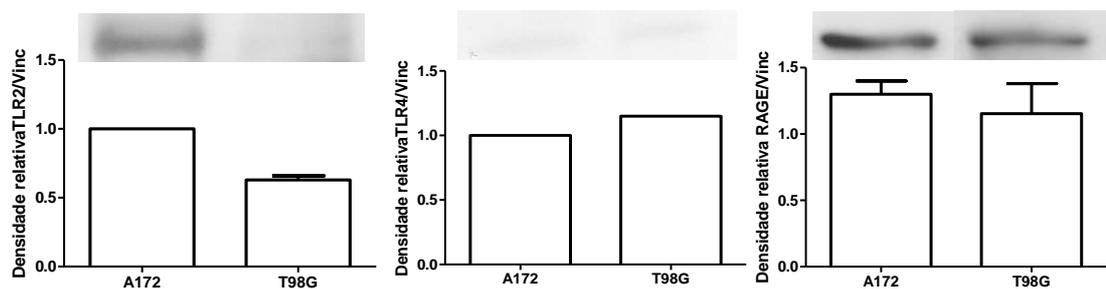


Figura 22: Expressão de TLR2, TLR4 e RAGE nas células A172 e T98G. Western blot indicou que expressão de TLR2 foi maior em A172 do que em T98G, enquanto TLR4 e RAGE parecem ser igualmente expressos em ambos glioblastomas. As imagens representam um experimento para TLR2 e -4 e dois experimentos para RAGE.

5.7 RAGE está envolvido na indução de proliferação por rSAA de células A172

Para a determinação dos receptores através dos quais SAA induziu proliferação nas células A172, avaliamos a possibilidade de TLR-2, TLR-4, RAGE e FPR2 estarem envolvidos, considerando que os mesmos são expressos no cérebro e que nas células A172 a realização de RT-PCR permitiu observarmos expressão de TLR2, TLR4 e RAGE (**Figura 21**). Portanto realizamos pré-tratamento com anticorpos neutralizantes para os receptores TLR2, TLR4 e RAGE e antagonista wrw4 para o receptor FPR2. Dentre os receptores avaliados, somente o anticorpo neutralizante anti-RAGE inibiu totalmente a proliferação das células A172 estimuladas com 5 µg/mL de rSAA e 75% a proliferação das células tratadas com 20 µg/mL de rSAA (**Figura 23**). Portanto, podemos sugerir que o efeito proliferativo induzido por rSAA em células A172 tem a participação de RAGE, entretanto outros receptores conhecidos para SAA e que não foram testados também podem estar envolvidos na viabilidade deste processo.

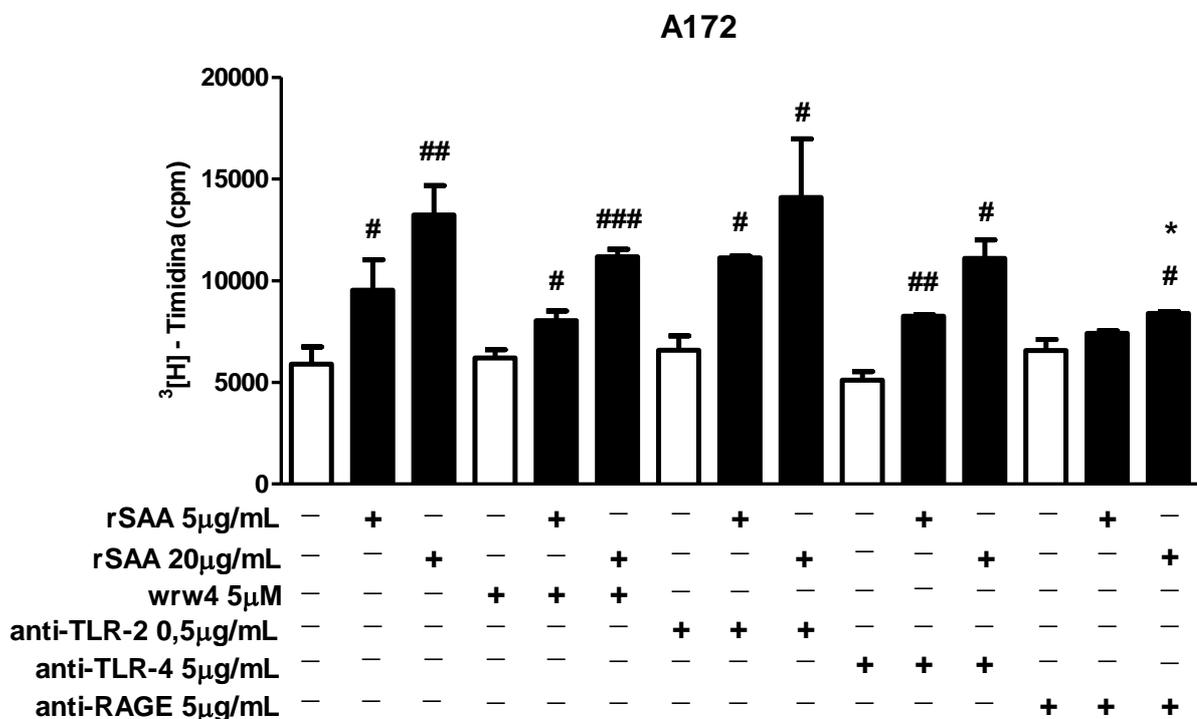


Figura 23: Efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na proliferação induzida por rSAA em células A172. $1,0 \times 10^4$ cells/mL foram cultivadas e quando alcançaram 70% de confluência foram sincronizadas por 48h em DMEM 0,5% FBS, pré-incubadas com os anticorpos neutralizantes por 2 h e estimuladas ou não com 5 ou 20 µg/mL de rSAA por 48 h. ^3H timidina foi adicionada às células 18 h antes de completar 48 h de tratamento com

*rSAA. Proliferação celular foi realizada usando um contador de cintilação. Dados representam a média de dois experimentos. * $p < 0,05$ versus controle estimulado com rSAA; # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$ versus o tratamento com seu respectivo anticorpo neutralizante.*

Com o objetivo de investigarmos as proteínas que podem estar envolvidas na sinalização da proliferação induzida por SAA em células A172, realizamos ensaio de incorporação de timidina e utilizamos inibidores para proteínas que já foram descritas por interagir com SAA, como: NF κ B (p50), MAPK (PD98059) e óxido nítrico (L-NAME (N- ω -nitro-L- arginine methyl ester). NF- κ B tem sido sugerido como um fator transcricional proliferativo em GBM (Mut et al., 2010; Miyakoshi & Yagi, 2000; Yamagishi, Miyakoshi & Takebe 1997) e, a ativação ou inativação de ERK1/2 tem sido associada a gênese dos tumores cerebrais (Cheng et al., 2013). Além disso, ERK1/2 é conhecida por ser ativada em resposta a fatores de crescimento (Byts et al., 2006; Hsieh et al., 2010; Su et al., 2011). Por fim, o interesse de investigar a participação de NO na proliferação dos GBM se deve ao fato do mesmo aumentar a tumorigênese (Choudary et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa já havia mostrado que rSAA induz proliferação de pré-adipócitos (Fillipin-Monteiro et al., 2011), secreção de CCL20 em células mononucleares via ERK1/2 e produção de NO por macrófagos (Sandri et al., 2008). Neste estudo, a pré-incubação de células A172 com 5 μ M de PD98059, 10 μ g/mL de inibidor de NF κ B (p50) e 0,4nM de L-NAME inibiu o efeito proliferativo de rSAA (**Figura 24**). Nós já havíamos mostrado que células A172 produzem NO quando estimuladas com rSAA (Knebel, 2013). Neste caso poderíamos sugerir que a produção de NO induzida por rSAA pode estar contribuindo para o aumento de proliferação nestas células. Okamoto e seus colaboradores (2008) mostraram que SAA em fibroblastos sinoviais de artrite reumatoide induzem NF κ B e expressão de IL-6 e IL-8 via RAGE.

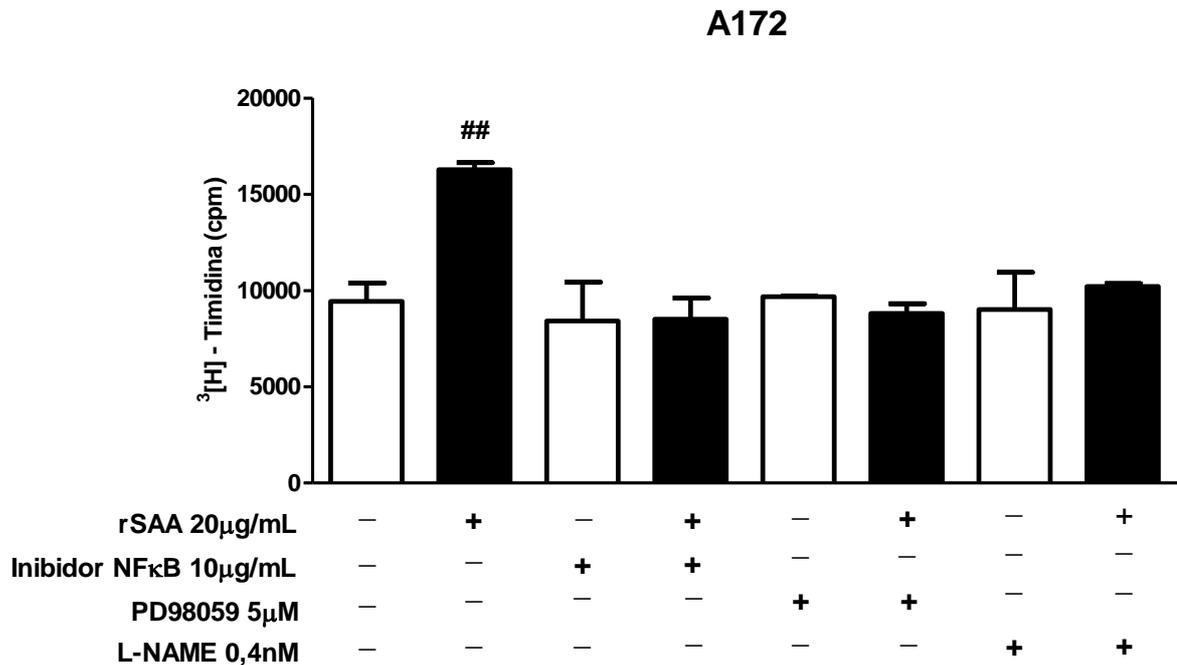


Figura 24: Efeito inibitório do inibidor de NF-κB, PD98059 e L-NAME na indução de proliferação de células A172 por rSAA. $1,0 \times 10^4$ células/mL foram cultivadas e quando alcançaram 70% de confluência foram sincronizadas por 48h em DMEM 0,5% FBS, pré-incubadas com os inibidores de NFκB, MAPK e L-NAME por 2 h e estimuladas ou não com 20 µg/mL de rSAA por 48 h. ^3H timidina foi adicionada às células 18 h antes de completar 48 h de tratamento com rSAA. Proliferação celular foi realizada usando um contador de cintilação. Dados representam a média de dois experimentos. * $p < 0,05$ versus controle estimulado com rSAA; ^{##} $p < 0,01$ versus controle.

5.8 TLR-4 participa da migração de A172

O ensaio de migração utilizando anticorpos neutralizantes para os receptores TLR-2, TLR-4 e RAGE permitiu verificar participação de TLR-4 na inibição de migração promovida por 20 µg/ml de rSAA em células A172. Nas Figuras 25 e 26 é possível observar que 5 µg/mL de anti-TLR4 previniu 40% da atividade inibitória de rSAA na migração das células A172 quando comparado ao controle tratado com rSAA.

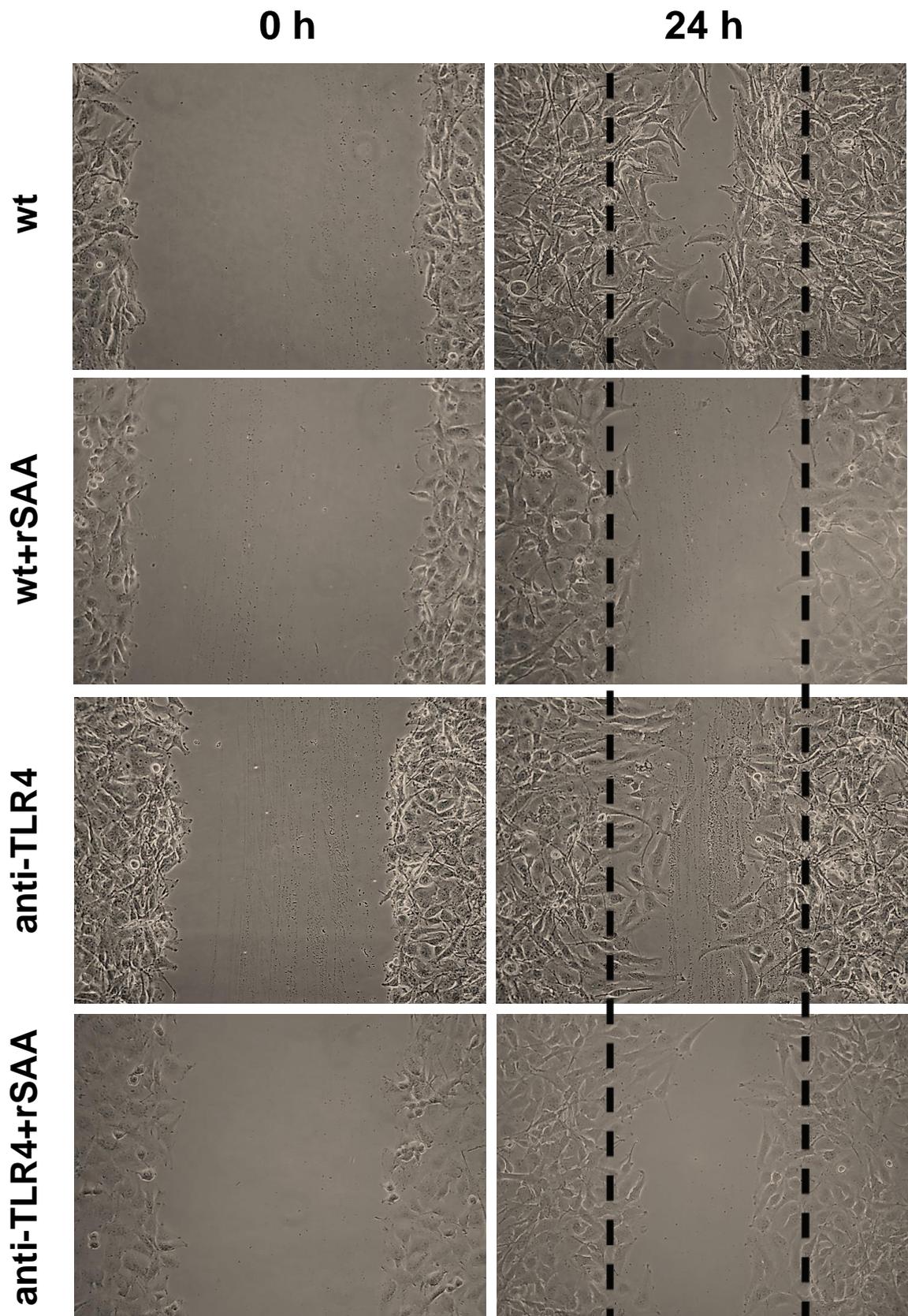


Figura 25: *Imagens do efeito do anticorpo neutralizante anti-TLR4 mostrando reversão da inibição de migração de células A172 por rSAA. 1×10^5 células/well foram cultivadas por 24 h e uma “ferida” central foi aberta após confluência celular. As células foram pré-incubadas*

com os anticorpos neutralizantes por 2 h em DMEM com 0,5% de SFB e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rSAA foi adicionada por 24h. As imagens foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de dois experimentos independentes.

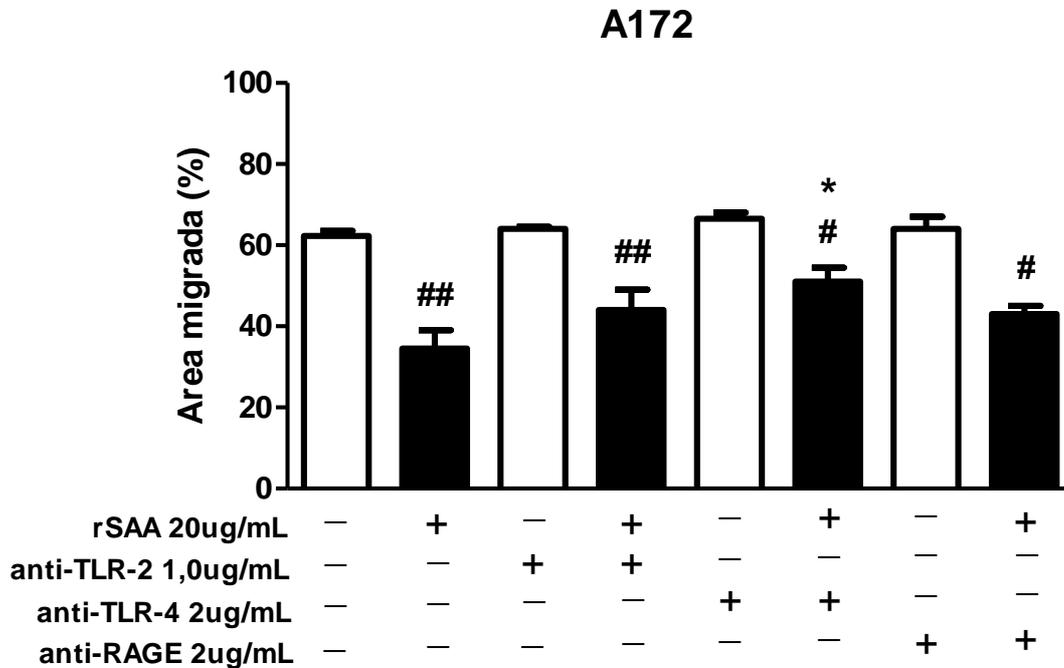


Figura 26: Anticorpo neutralizante-TLR4 preveniu a inibição de migração de células A172 por rSAA. Scratch test foi realizado para avaliação do envolvimento de TLR-2, TLR-4, RAGE na migração. Quantificação da área migrada foi realizada no software Axio Vision 4.8. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ versus controle estimulado com rSAA; # $p < 0,05$; e ## $p < 0,01$ quando comparado ao respectivo controle e KD não estimulado com rSAA.

5.9 TLR-4 está envolvido na inibição de invasão por SAA em células A172

No processo de invasão, assim como na migração observamos que TLR-4 está envolvido na sinalização de invasão em células A172 via rSAA. Anti-TLR4 foi capaz de prevenir 50% do efeito inibitório da rSAA na invasão (**Figuras 27 e 28**).

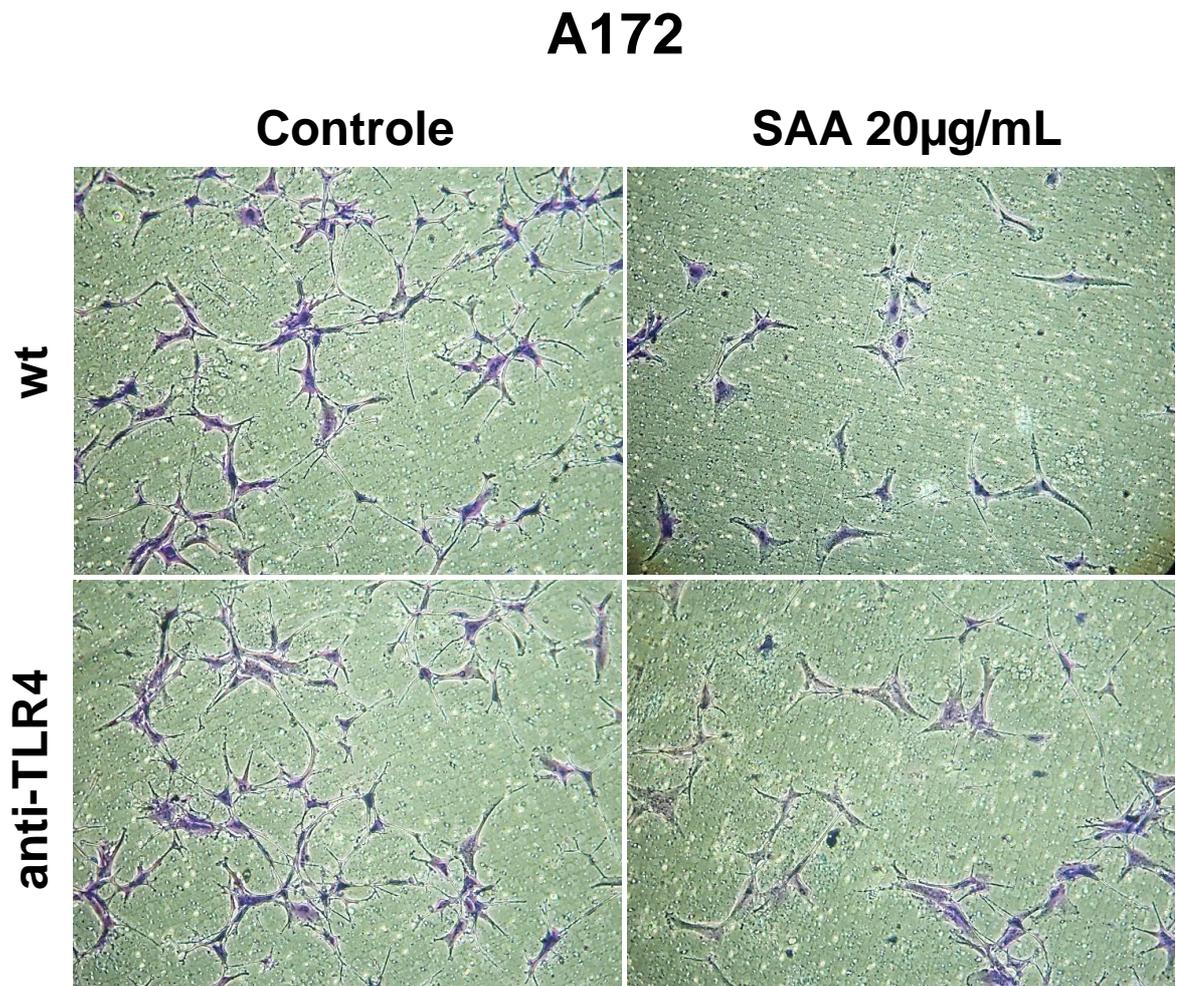


Figura 27: *Imagens do efeito do anticorpo neutralizante anti-TLR4 mostrando reversão da inibição de invasão de células A172 por rSAA. Trans well foi realizado para avaliação do envolvimento de TLR4 na invasão. 6×10^4 células/mL foram pré-incubadas por 2 h com os anticorpos neutralizantes e 20 µg/mL de rSAA foi adicionada por 48 h. As imagens foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico. As fotos representam dois experimentos independentes.*

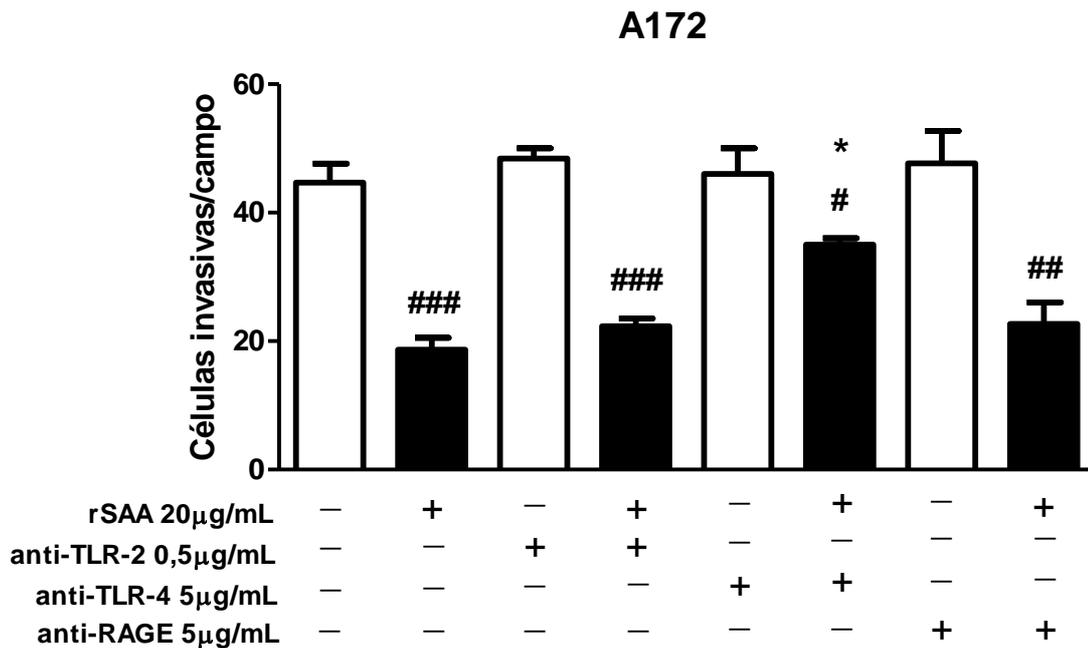


Figura 28: Anticorpo neutralizante-TLR4 preveniu a inibição de invasão de células A172 por rSAA. Trans well foi realizado para avaliação do envolvimento de TLR2, TLR4 e RAGE na invasão. As células foram pré-incubadas com os anticorpos neutralizantes por 2 h em DMEM com 0,5% de SFB e 20 µg/mL de rSAA foi adicionada por 48h. Foram quantificados dez campos do total de células que invadiram o matrigel® na ausência e presença de 20 µg/mL de rSAA. Os dados representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes. # $p < 0,05$ versus controle tratado com rSAA; e ### $p < 0,01$ quando comparado aos respectivos controles não estimulados com rSAA.

Expressão de TLR4 em células tumorais é conhecido por mediar a resposta imune inata, estimulando o crescimento e migração do tumor. Entretanto, alguns estudos mostram efeito dual de TLR em células tumorais, podendo desenvolver atividades pró-apoptóticas ou promover sobrevivência dependendo das condições. Alguns *clinical trials* envolvem agonistas de TLR como indutores de uma resposta anti-tumor (para revisão ver Wolska et al., 2009). Receptores TLR4 são reconhecidos e ligam-se a um grande grupo de moléculas endógenas encontrados no sítio da inflamação, como componentes da matriz extracelular, proteína de fase aguda, como a SAA (Sandri et al., 2008) e fibrilas amyloid- β (ver revisão Eklund, Niemi e Kovanen, 2012). Villalba e seus colaboradores (2012) mostraram que infecção de culturas primárias de astrócitos de camundongos ativaram TLR2 e 4, bem como aumentaram SAA e IL-6, e sugerem que a interação dos receptores TLR com SAA endógena pode potencializar a resposta neuroinflamatória.

Hsiao e seus colaboradores (2013) descreveram que células de hepatoblastoma superexpressam TLR4 e o tratamento destas células com o

agonista de TLR4, o LPS, inibiu a atividade de MMP2, diminuindo motilidade e invasividade. Assim como SAA, HMGB1 é conhecida por se ligar aos receptores TLR2, TLR4 e RAGE e tem sido descrita como uma proteína importante para o crescimento e migração de células de glioma (Bassi, 2007).

O efeito inibitório sobre a migração e invasão de rSAA via TLR4 em gliomas lembram os efeitos descritos para HMGB1. Dai e seus colaboradores (2010) mostraram que HMGB1 pode ser uma molécula endógena envolvida na inibição da migração e invasão de enterócitos por aumentar a adesividade destas células via TLR4. Estudo realizado por Bauer e seus colaboradores (2013) sugeriu que HMGB1 promoveu migração de células endoteliais de veia umbilical humana, enquanto o tratamento de células endoteliais de artéria pulmonária humana com HMGB1 induziu diminuição de migração dependente de TLR4.

Os resultados obtidos com células A172 mostram que SAA induz aumento de proliferação e este processo parece ser independente de migração e invasão, principalmente por serem viabilizados por diferentes receptores. Para proliferação SAA utiliza o receptor RAGE (**Figura 23**), enquanto para migração (**Figuras 25 e 26**) e invasão (**Figuras 27 e 28**) utiliza TLR4. Portanto, a determinação do uso de um receptor parece estar relacionado a natureza multiligante da SAA e às diferenças genéticas existentes entre as células de gliomas deste estudo.

SAA se liga tanto a RAGE quanto a TLR4 em células A172 e dependendo do receptor parece ativar vias de sinalização diferenciadas. rSAA sendo um agonista conhecido de TLR-4 pode se ligar ao mesmo e aumentar a adesão de células A172 ou através deste inibir moléculas importantes para a invasão tumoral como as MMPs e assim inibir migração e invasão. Este achado parece ser similar ao relatado para LPS, também um ligante de TLR4, no estudo descrito por Hsiao e seus colaboradores (2013).

5.10 RAGE participa da migração e invasão de células T98G

Realizamos ensaio de migração por *scratch test* e de invasão por *trans well* utilizando anticorpos neutralizantes para clássicos receptores da SAA, a fim de avaliarmos os receptores envolvidos na viabilização destes processos por rSAA. O tratamento com anticorpos neutralizantes anti-TLR2, anti-TLR4 e anti-RAGE não afetaram a migração e invasão das células se comparado ao controle, entretanto,

quando adicionamos 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rSAA observamos que apenas RAGE dentre os receptores testados inibiu aproximadamente 60% a migração e 47% a invasão destas células se compararmos a migração e invasão induzida pela rSAA sozinha, indicando que migração e invasão de células T98G via SAA são dependentes de RAGE (Figuras 29 e 30).

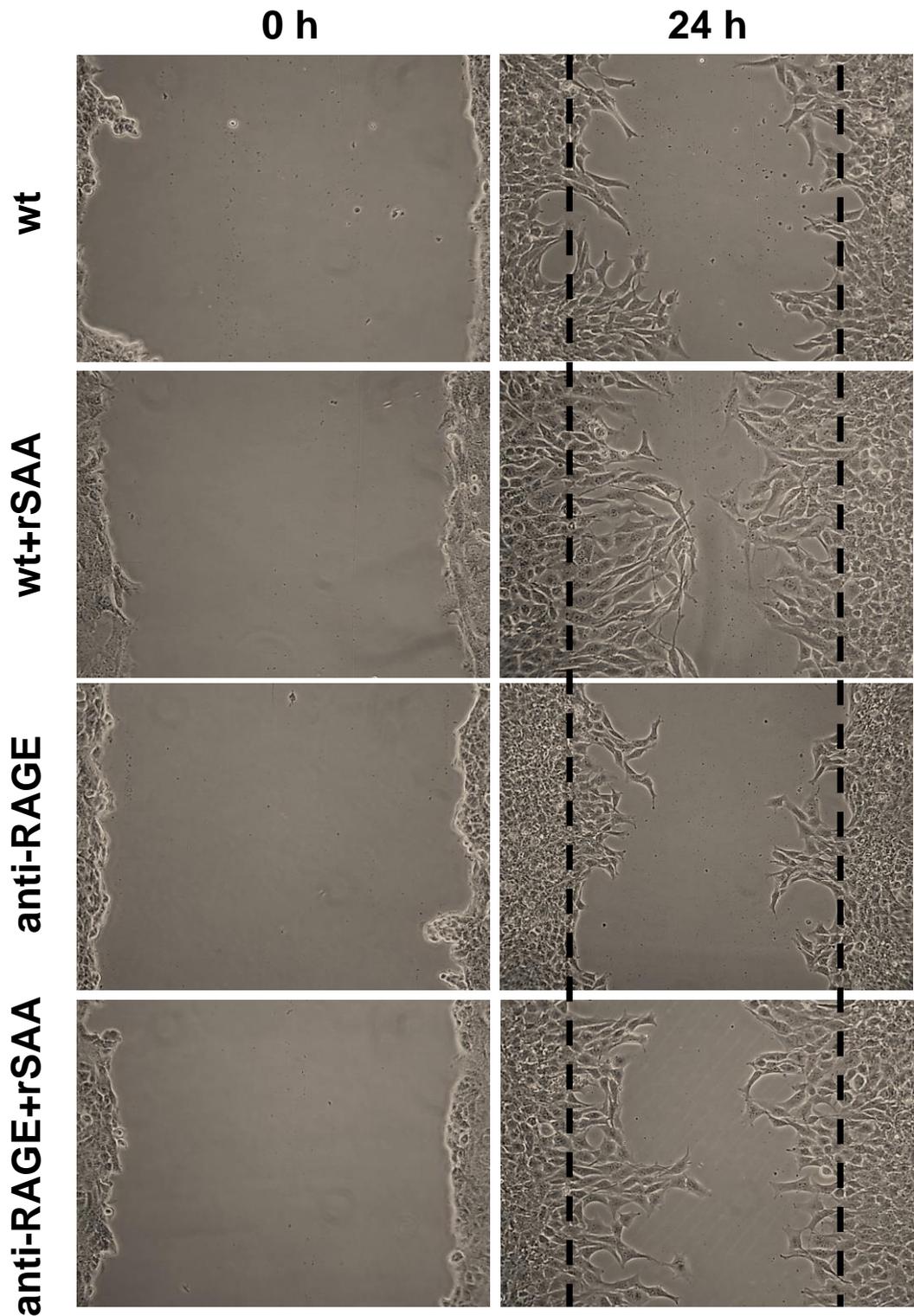


Figura 29: Imagens do efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na migração de células T98G induzida por rSAA. 1×10^5 células/well foram cultivadas por 24 h, uma “ferida” central foi aberta após confluência celular. As células foram mantidas em DMEM com 0,5% de SFB na ausência e presença de $20 \mu\text{g/mL}$ de rSAA. Depois de 24 h a migração foi estimada. As imagens foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de dois experimentos independentes.

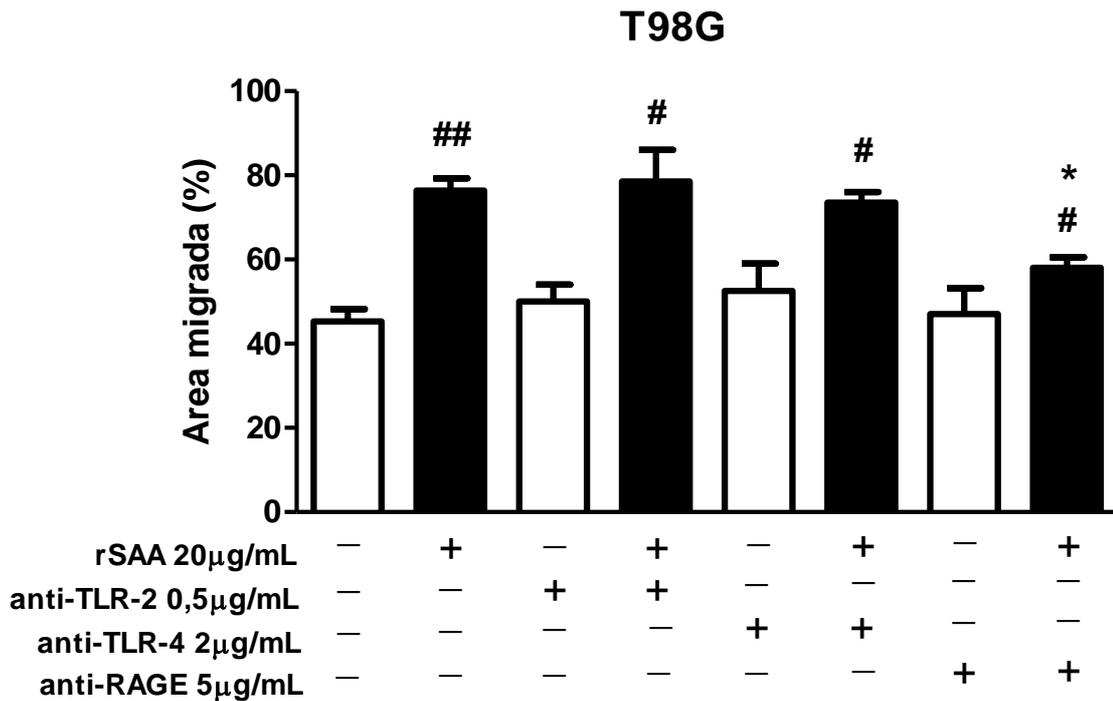


Figura 30: Efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na indução de migração de células T98G por rSAA. Scratch test foi realizado para avaliação do envolvimento de TLR-2, TLR-4 e RAGE na migração. Quantificação da área migrada foi realizada no software Axio Vision 4.8. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ versus controle estimulado com rSAA. # $p < 0,05$; e ## $p < 0,01$ quando comparado ao respectivo controle e KD não estimulado com rSAA.

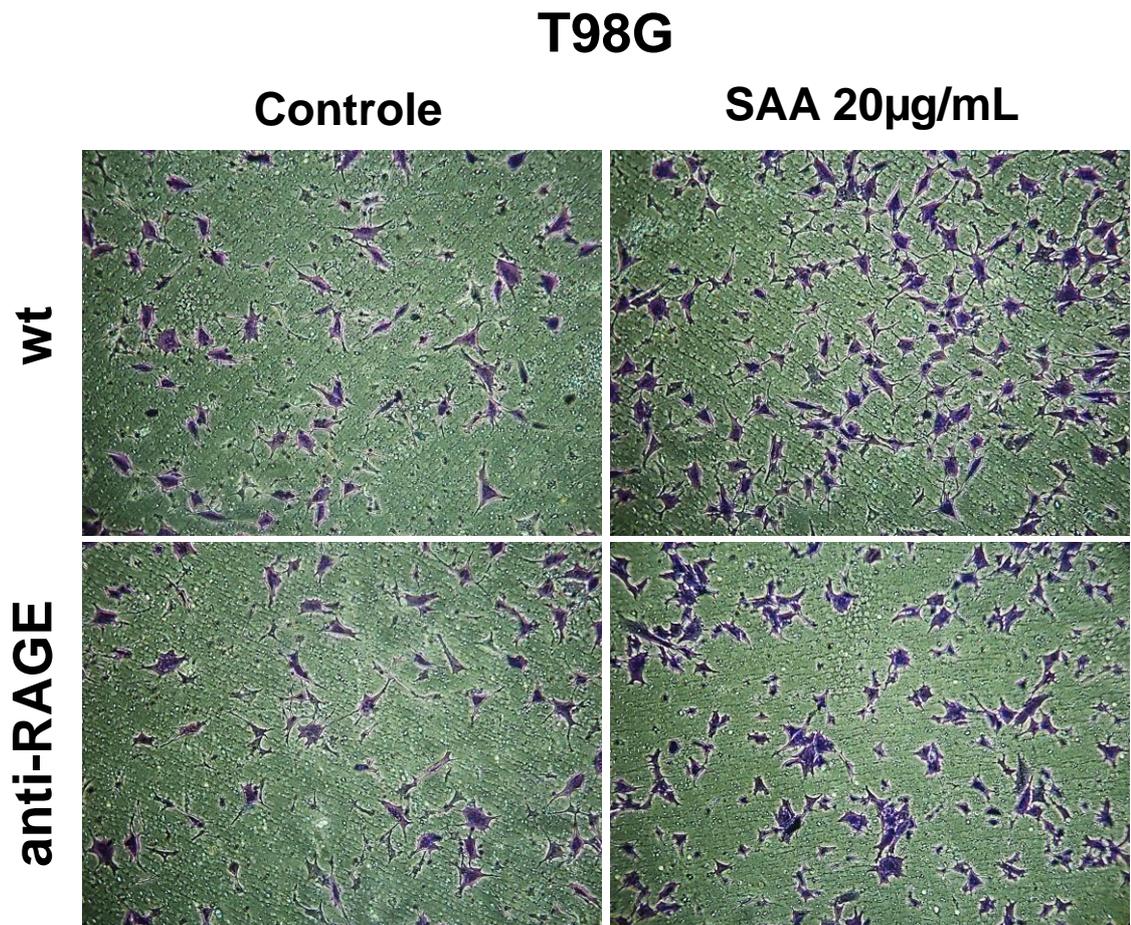


Figura 31: *Imagens do efeito inibitório do anticorpo neutralizante anti-RAGE na indução de invasão de células T98G por rSAA. Trans well foi realizado para avaliação do envolvimento de RAGE na invasão. 6×10^4 células/mL foram pré-incubadas por 2 h com os anticorpos neutralizantes e 20 µg/mL de rSAA foi adicionada por 48 h. As imagens foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico. As fotos representam dois experimentos independentes.*

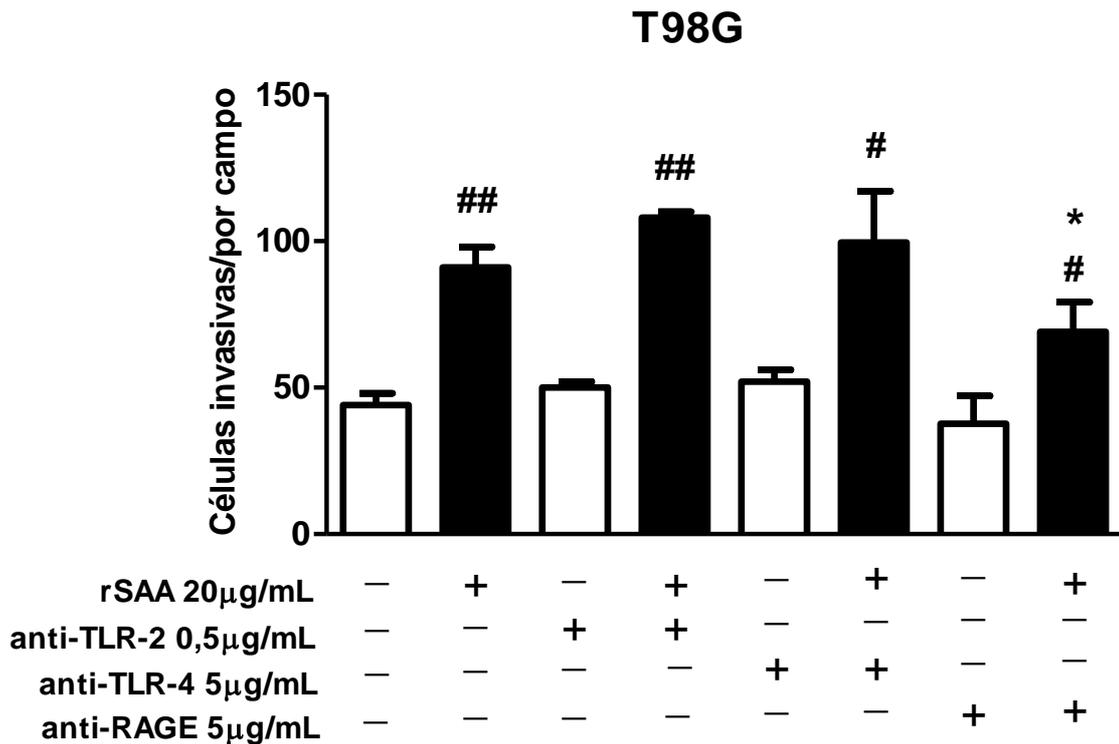


Figura 32: Efeito inibitório do anticorpo neutralizante-RAGE na indução de invasão de células T98G por rSAA. Trans well foi realizado para avaliação do envolvimento de TLR2, TLR4 e RAGE na invasão. Quantificação do número total de células que invadiram o matrigel® na ausência e presença de 20 µg/mL de rSAA. Os dados representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ versus controle estimulado com rSAA. # $p < 0,05$; e ## $p < 0,01$ quando comparado aos respectivos controles não estimulados com rSAA.

5.11 Sinalização envolvida na indução de migração de GBM por SAA

Realizamos *scratch test* para entendermos quais as proteínas que poderiam estar envolvidas na indução da migração por rSAA. Evidências indicam que as MAPK são funcionalmente importantes para a proliferação de gliomas (Holland et al., 2000 e Edwards et al., 2006) e a função mitogênica da cascata Ras-RAF-MEK-ERK no desenvolvimento de tumores cerebrais é bem conhecida (para revisão ver Cheng et al., 2013). Portanto, utilizamos o inibidor de ERK1/2 (PD98059) e o inibidor de Ras (inibidor da proteína farnesyltransferase) e observamos que PD98059 foi capaz de inibir 44% e farnesyltransferase 48% da migração de células T98G (**Figura 33**), sugerindo que estas proteínas estão envolvidas na sinalização da indução de migração por SAA.

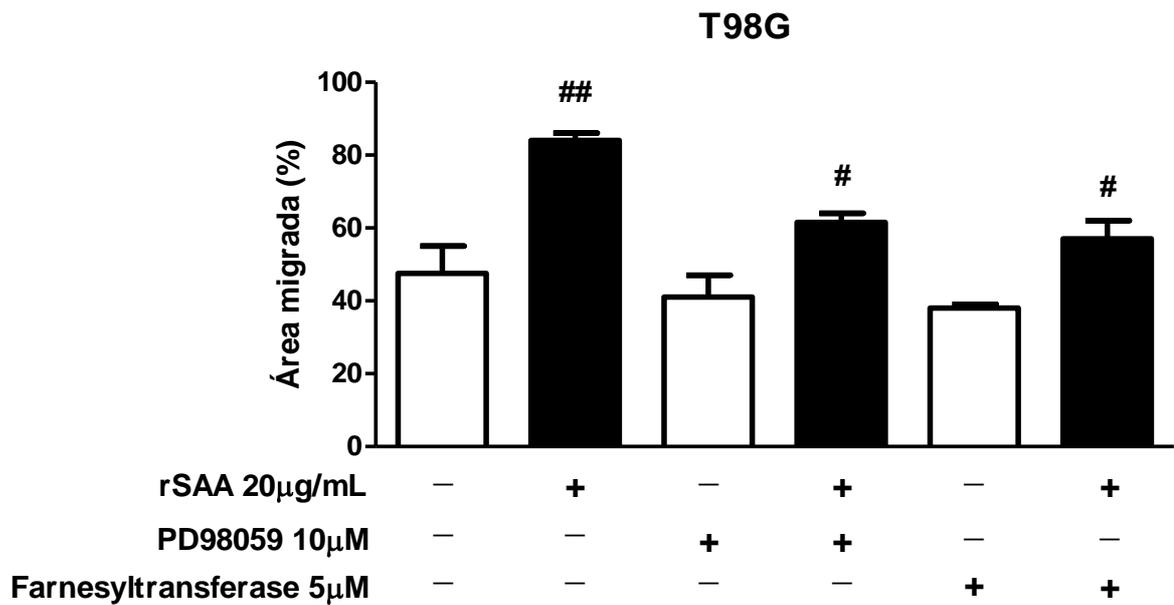


Figura 33: Efeito inibitório de PD98059 e do inibidor farnesyltransferase na indução de migração de células T98G por rSAA. Scratch test foi realizado para avaliação do envolvimento de ERK1/2 e Ras na migração. Quantificação da área migrada foi realizada no software Axio Vision 4.8. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. # $p < 0,05$; e ## $p < 0,01$ quando comparado aos respectivos controles não estimulados com rSAA.

Os mecanismos através dos quais SAA induz proliferação, migração e invasão em células T98G parece ser similar ao desenvolvido pela proteína HMGB1, a qual sinaliza através de RAGE processos como: quimiotaxia, proliferação, migração (Kang et al., 2013). Nas células T98G a SAA também tem desempenhado estas funções. HMGB1 foi descrita por promover crescimento e migração de células T98G via eixo MAPK/ERK e RAGE (Bassi et al., 2008), de maneira semelhante em que observamos em nosso estudo. Além disso, *knockdown* de HMGB1 também inibiu crescimento e invasão de células de câncer gástrico (Zhang et al., 2014), assim como observamos para os KDs de SAA em células T98G.

No nosso estudo chama a atenção as diferenças de resposta das células T98G e A172 frente a SAA. Dentre as diferenças genéticas já descritas para os gliomas A172 e T98G, o status de p53 tem alcançado destaque em inúmeros estudos por controlar o processo de carcinogênese e, portanto ser essencial para a determinação da resposta de células cancerosas. T98G apresenta p53 mutante e A172 apresenta o mesmo selvagem (Van Meier et al., 1994). Baixa expressão de p53 ou perda da função permite a ativação de muitos genes pró-sobrevivência e

desenvolvimento de um fenótipo maligno e resistente a apoptose em células cancerosas (Soussi & Wiman, 2007).

Soengas e seus colaboradores (1999) também mostraram que p53 wt foi responsável por mediar apoptose em fibroblastos de camundongos via ativação de caspase. Além disso, outro estudo mostrou que cisplatina foi citotóxica para células A172, enquanto células T98G foram resistentes ao tratamento e esta resistência foi associada ao status de p53 (Park, 2006). Outras diferenças genéticas conhecidas entre T98G e A172 são os genes PTEN (Zhang, Banik & Ray, 2008) e ADAM23 (Costa et al., 2005), além dos balanços diferenciais de VEGF (Yao et al., 2006), MMPs (Corrêa et al., 2006; Knebel, 2009) e TIMPs (Corrêa et al., 2006) que também podem contribuir para a diversidade de respostas observadas no nosso estudo.

6 Silenciamento da SAA

6.1 Desenvolvimento e validação de *knockdowns* para SAA em GBM

Para a obtenção de GBM *knockdowns* para os diferentes genes da SAA (SAA1, SAA2 e SAA4) foi realizada a técnica de transfecção lentiviral e foram empregados 15 plasmídeos shRNA comerciais validados. Deste total, cinco seriam capazes de suprimir o gene SAA1, os outros cinco o gene SAA2 e os demais 5 plasmídeos seriam eficientes para suprimir o gene SAA4. Realizamos análise destes plasmídeos no software Blast da NCBI e, constatamos que destes quinze plasmídeos adquiridos comercialmente, nove deles eram capazes de suprimir tanto o gene SAA1 quanto o gene SAA2, apenas 1 plasmídeo seria capaz de silenciar o gene SAA1 e cinco suprimiriam de maneira específica o gene SAA4.

Inicialmente foi realizado crescimento dos plasmídeos em bactéria competente (*Escherichia coli* alpha) para obtenção do DNA dos plasmídeos. Estes então foram purificados através do HiPure Plasmid Maxiprep kit (Invitrogen). A fim de nos certificarmos de que realmente o DNA purificado era o plasmídeo de interesse no vetor pLKO, realizamos digestão dos mesmos com enzima de restrição específica e aplicamos as amostras em gel de agarose 1% . Podem ser observadas bandas no gel em torno de 7000 kDa que correspondem aos DNA plasmidiais purificados no vetor pLKO (Figura 34).

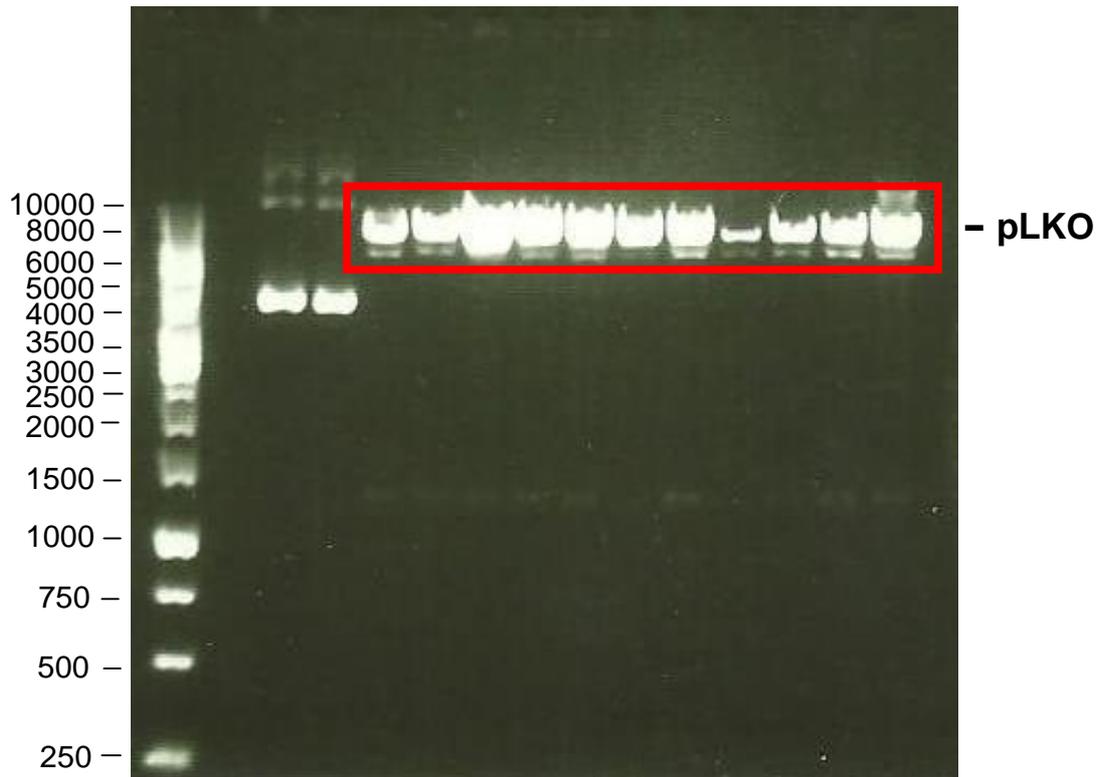


Figura 34: Eletroforese em gel de agarose indica que os DNA purificados são os plasmídeos de interesse inseridos no vetor pLKO. Bandas em torno de 7000 kDa correspondem ao vetor pLKO, no qual estão inseridos os plasmídeos. O gel representa um único experimento.

Estes DNAs foram empregados na transfecção de células HEK293 e as partículas virais oriundas deste processo foram usadas para a realização da infecção das células de GBM. Para avaliação da eficiência de supressão de SAA nos *knockdowns* obtidos com os diferentes plasmídeos testados realizamos qRT-PCR das células A172 e T98G e a porcentagem de inibição da transcrição de SAA1, SAA1/2 e SAA4, bem como a supressão da proteína podem ser observados nas tabelas e figuras que seguem abaixo. Com o amparo destas duas técnicas, nós selecionamos para os estudos subseqüentes o plasmídeo que suprimiu com maior eficiência cada gene que codifica para as proteínas SAA.

6.1.1 *Knockdown* de SAA1 e SAA1/2

A realização da técnica de transfecção utilizando dez plasmídeos shRNA para os genes SAA1 e 2, mostrou que deste total, três induziram a morte das células,

dentre eles, os plasmídeos 460, 343 e 511 (**Figura 38**). Inicialmente consideramos que este efeito poderia ter sido intercorrência da técnica e tornamos a repetir o protocolo de silenciamento, entretanto, observamos novamente a perda da viabilidade celular. Por este motivo, nesta segunda repetição, antes mesmo de todas as células perderem a viabilidade nós extraímos RNA, convertimos a cDNA e realizamos RT-PCR para avaliação da transcrição dos genes da SAA e observamos que a eficiência do silenciamento de SAA nas mesmas foi próximo a 100% (**Quadro 3 e Figura 35**). Este dado permitiu considerar que os genes da SAA poderiam ser extremamente importantes para a proliferação destas células, bem como para a morfologia, conforme se pode observar na Figura 38.

O plasmídeo 474, que de acordo com o *Blast* silencia apenas SAA1, mostrou uma eficiência de silenciamento de 65% nas células A172 (**Quadro 3, Figura 35**) e confirmou a especificidade uma vez que apresentou transcrição de SAA2 preservada (**Quadro 4, Figura 36**). Além disso, os plasmídeos 140 e 241 não inibiram a transcrição de mRNA do gene SAA1 (**Figura 35**), mas sim do gene SAA2, em 40% e 87% respectivamente (**Figura 36**), entretanto, a inibição de 40% na transcrição do gene SAA2 promovida pelo plasmídeo 140 não diminuiu a concentração de proteína SAA se comparado ao controle (**Figura 37**).

De uma maneira geral, os plasmídeos testados foram eficientes em silenciar os genes SAA1 e 2 nas células A172, bem como alteraram ou comprometeram o crescimento das mesmas, alguns com maior eficiência, outros com menor eficiência (**Quadro 3, Quadro 4, Figura 35, Figura 36, Figura 37, Figura 38 e Figura 39**). A análise proteica através de kit de ELISA mostrou que apenas o plasmídeo 140 não suprimiu SAA1/2 (**Figura 37**).

Quadro 3. Eficiência no silenciamento do gene SAA1 e efeito no crescimento em células A172, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.

A172					
shRNA	Plasmídeos comerciais Sigma	Nomenclatura usada no estudo	Blast	Eficiência <i>knockdown</i> mRNA	Efeito no crescimento *
SAA1	83048	460	SAA1/2	98%	Morte
	83049	336	SAA1/2	80%	Redução
	83050	511	SAA1/2	94%	Morte
	83051	474	SAA1	65%	Redução
	83052	343	SAA1/2	97%	Morte
	154668	258	SAA1/2	84%	Redução
	154805	135	SAA1/2	85%	Redução
	155107	153	SAA1/2	72%	Não
	156029	241	SAA1/2	0%	Não
	156178	140	SAA1/2	0%	Não

*Análise qualitativa por microscopia.

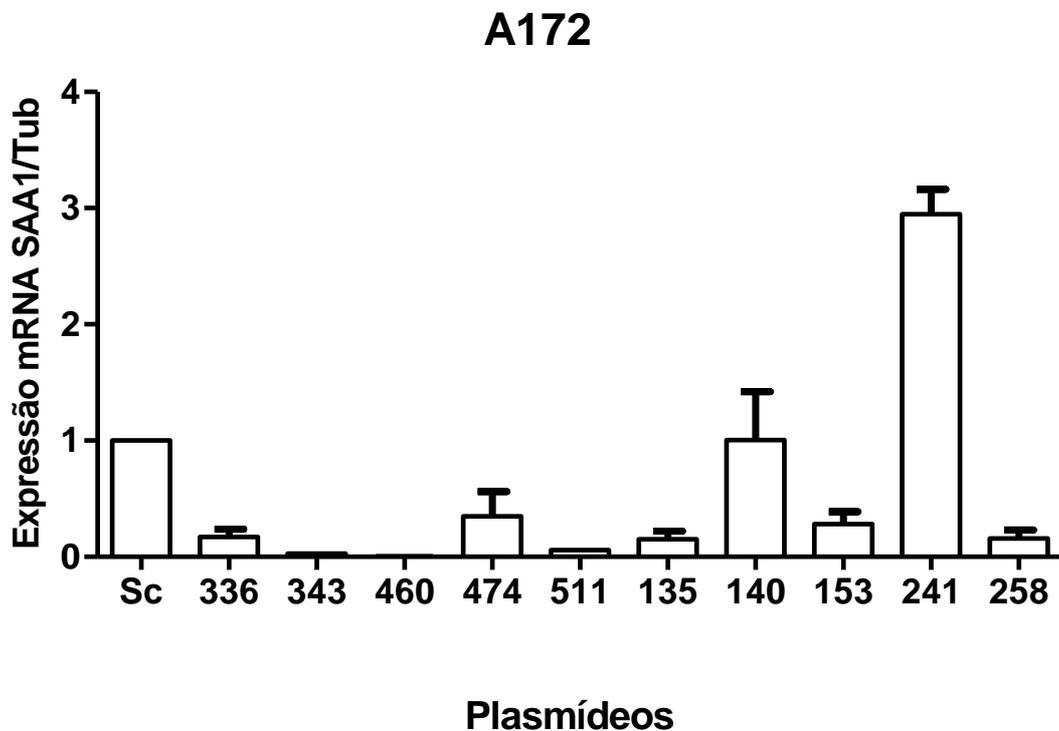


Figura 35: Transcrição de *mRNA* do gene *SAA1* em células A172 silenciadas com diferentes plasmídeos *shRNA* para *SAA1/2*. RT-PCR foi realizado para quantificar a supressão de *mRNA* do gene *SAA1*. Os plasmídeos 140 e 241 não inibiram a transcrição de *SAA1*. Dados representam a média de três experimentos.

Quadro 4. Eficiência no silenciamento do gene SAA2 e efeito no crescimento em células A172, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.

A172					
shRNA	Plasmídeos comerciais Sigma	Nomenclatura usada no estudo	Blast	Eficiência <i>knockdown</i> mRNA	Efeito no crescimento*
SAA2	83048	460	SAA1/2	98%	Morte
	83049	336	SAA1/2	86%	Redução
	83050	511	SAA1/2	89%	Morte
	83051	474	SAA1	0%	Redução
	83052	343	SAA1/2	93%	Morte
	154668	258	SAA1/2	89%	Redução
	154805	135	SAA1/2	82%	Redução
	155107	153	SAA1/2	90%	Não
	156029	241	SAA1/2	87%	Não
	156178	140	SAA1/2	40%	Não

*Análise qualitativa por microscopia.

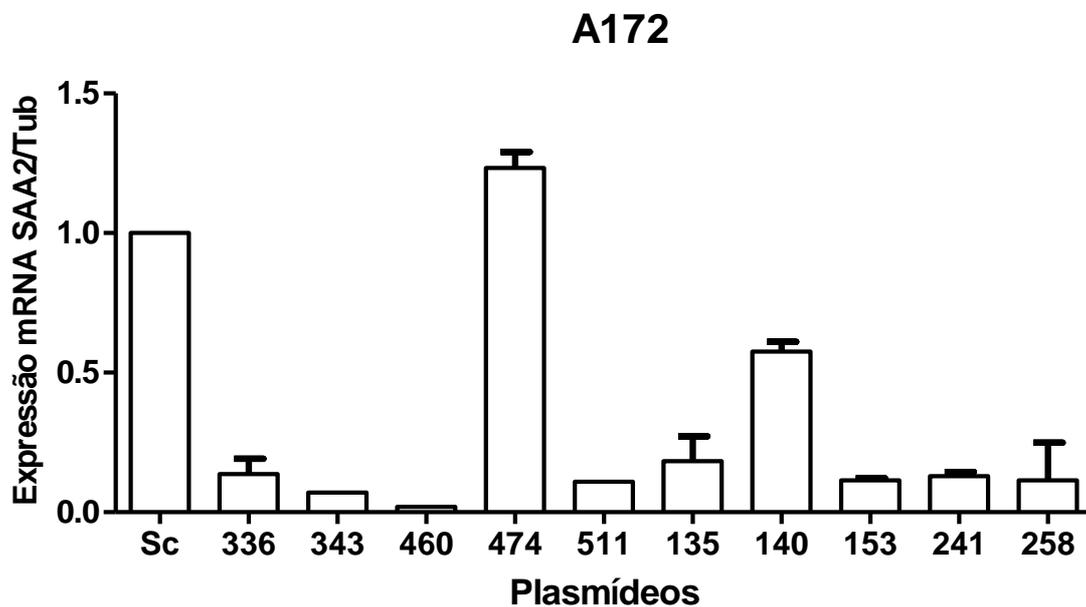


Figura 36: Transcrição de mRNA do gene SAA2 em células A172 silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA1/2. RT-PCR foi realizado para quantificar a supressão de mRNA do gene SAA2. A maioria dos plasmídeos testados mostrou eficiente inibição de transcrição de SAA2. O plasmídeo 474 mostrou especificidade para o gene SAA1, não inibindo a transcrição de SAA2. Dados representam a média de três experimentos.

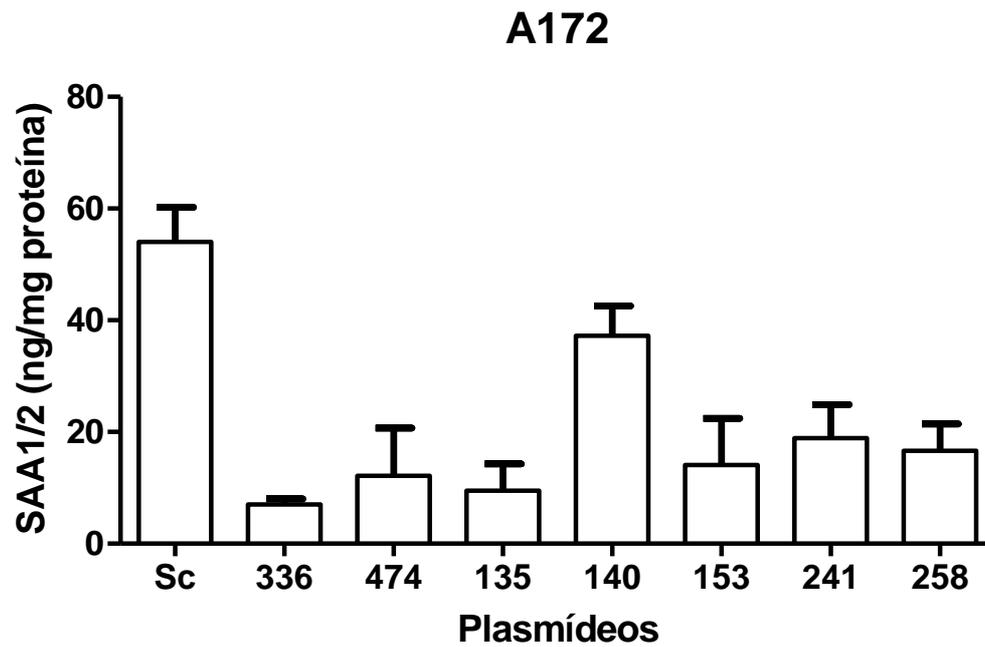


Figura 37: *Produção da proteína SAA1/2 em células A172. Quantificação da proteína SAA1/2 em células silenciadas usando diferentes plasmídeos foi realizada com kit de ELISA para SAA1/2. Dados representam a média de três experimentos.*

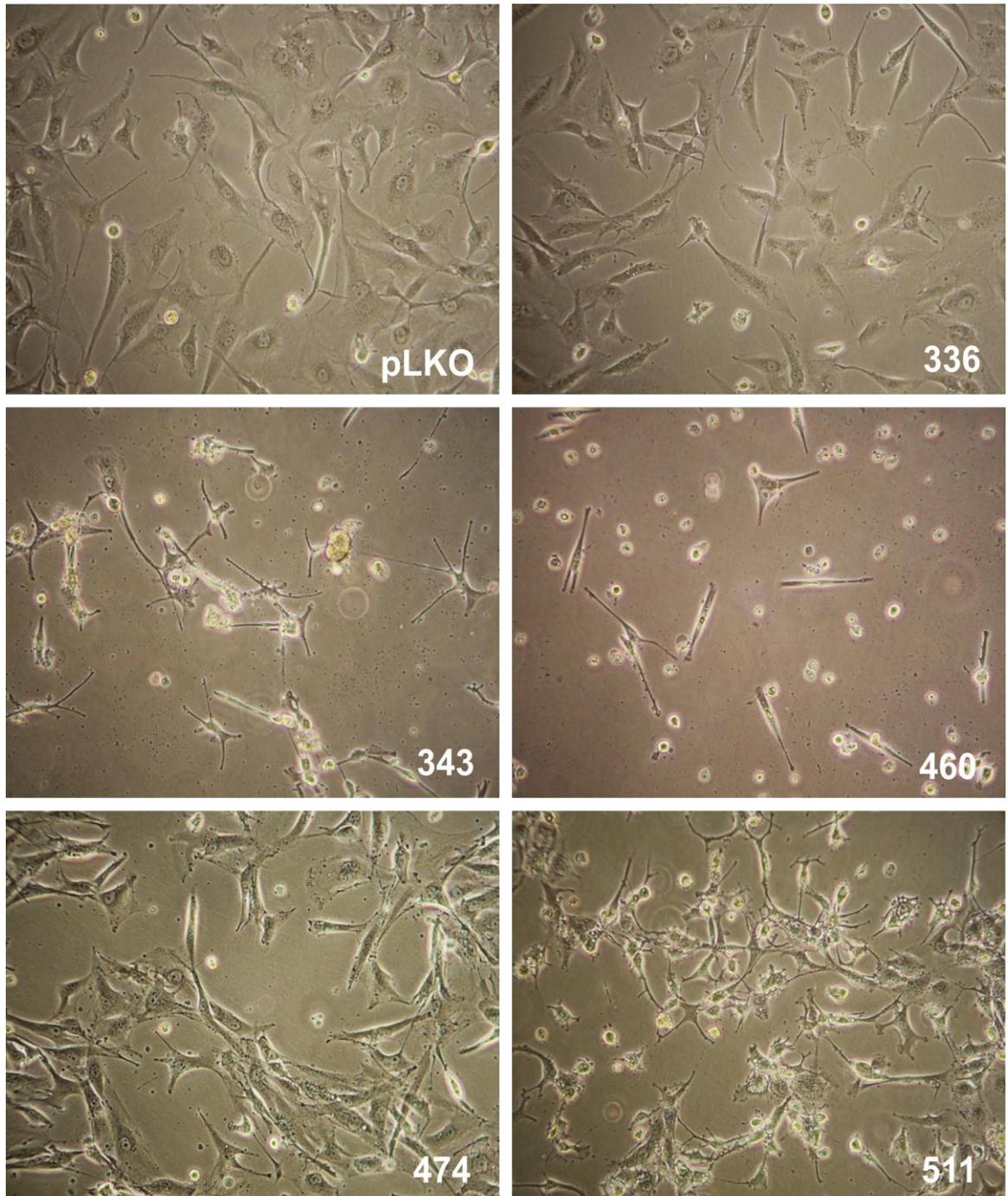


Figura 38: Aspecto morfológico da linhagem A172 durante silenciamento com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2. Note que os clones 343, 460 e 511 tiveram sua morfologia alterada e proliferação afetada. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de um experimento independente.

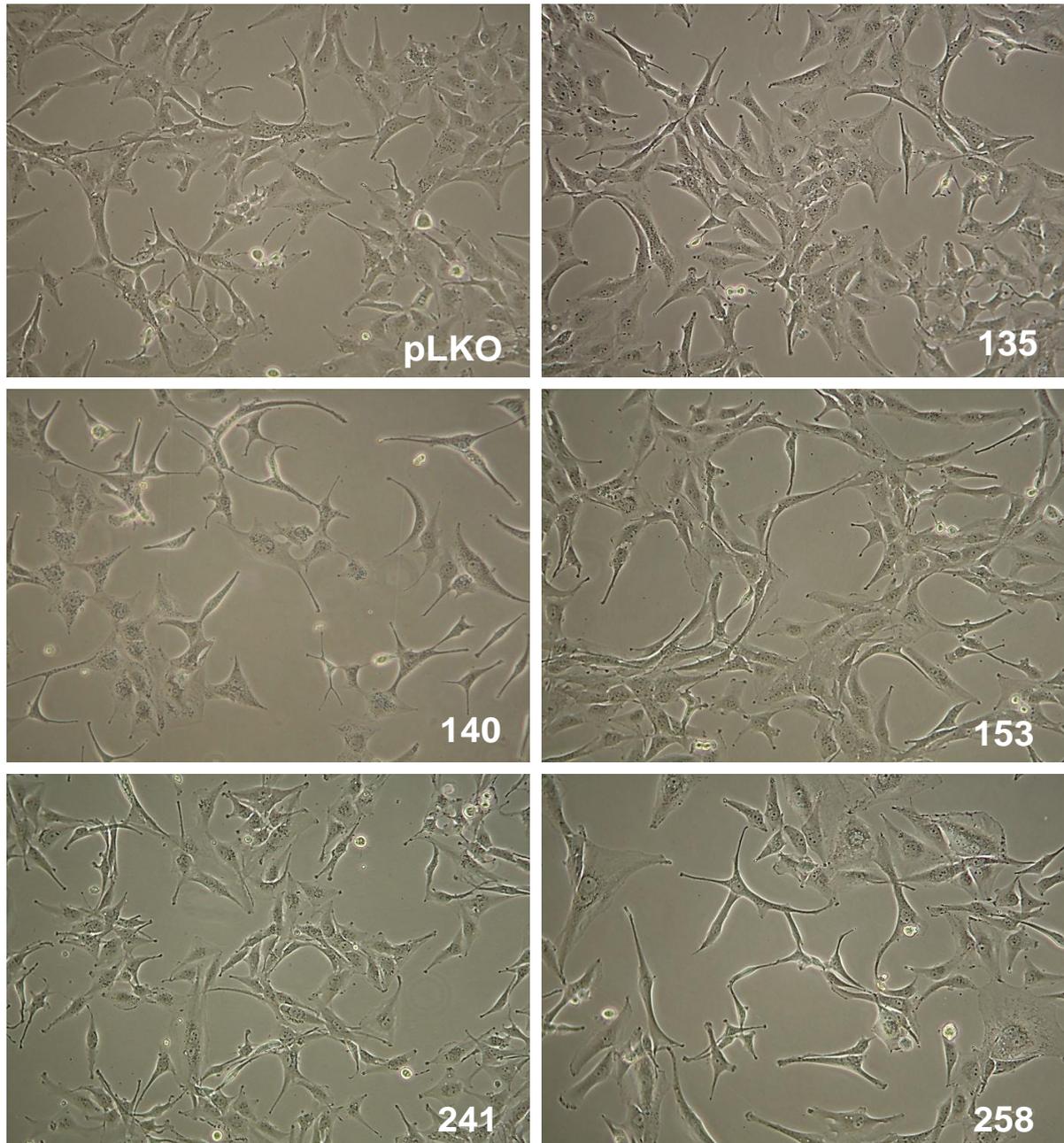


Figura 39: *Aspecto morfológico da linhagem A172 durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2. Note que as células silenciadas com os plasmídeos 140, 153 e 258 adquiriram formato mais alongado se comparado ao controle que contém apenas o vetor pLKO. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de um experimento independente.*

O silenciamento dos genes SAA1 e 2 nas células T98G, utilizando diferentes plasmídeos, mostrou que dos dez plasmídeos utilizados, seis apresentaram sucesso na transfecção do gene SAA1/2 e o plasmídeo 474 suprimiu o gene SAA1 (**Quadro 5 e 6; Figuras 40 e 41**). Os plasmídeos 511 e 135 inibiram a transcrição de mRNA do gene SAA1 em 49% e 96% respectivamente, mas não silenciaram o gene SAA2

(Quadro 5 e 6; Figuras 40 e 41). O plasmídeo 140 não silenciou SAA1, nem SAA2 (Tabela 3, Figura 41, Figura 5 e Figura 6). A grande maioria dos plasmídeos shRNA testados induziram alterações morfológicas, bem como comprometeram o crescimento das células (Quadro 5, Quadro 6, Figura 43 e Figura 44). Na linhagem T98G, as células silenciadas com o plasmídeo 343 também tiveram a proliferação afetada (Figura 43), entretanto, menos que nas células A172 (Figura 38). Nas células T98G diferentemente das células A172, não obtivemos uma boa eficiência na supressão da transcrição de SAA2 (Quadro 5 e 6), entretanto a análise de proteína, usando kit de ELISA mostrou supressão de SAA1/2, com exceção das células silenciadas com o plasmídeo 140, assim como para A172 (Figura 42).

Quadro 5. Eficiência no silenciamento do gene SAA1 e efeito no crescimento em células T98G, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.

T98G					
shRNA	Plasmídeos comerciais Sigma	Nomenclatura usada no estudo	Blast	Eficiência <i>knockdown</i> mRNA	Efeito no crescimento*
SAA1	83048	460	SAA1/2	90%	Não
	83049	336	SAA1/2	55%	Redução
	83050	511	SAA1/2	49%	Não
	83051	474	SAA1	80%	Não
	83052	343	SAA1/2	75%	Redução
	154668	258	SAA1/2	96%	Redução
	154805	135	SAA1/2	96%	Redução
	155107	153	SAA1/2	80%	Não
	156029	241	SAA1/2	65%	Não
156178	140	SAA1/2	0%	Não	

*Análise qualitativa por microscopia.

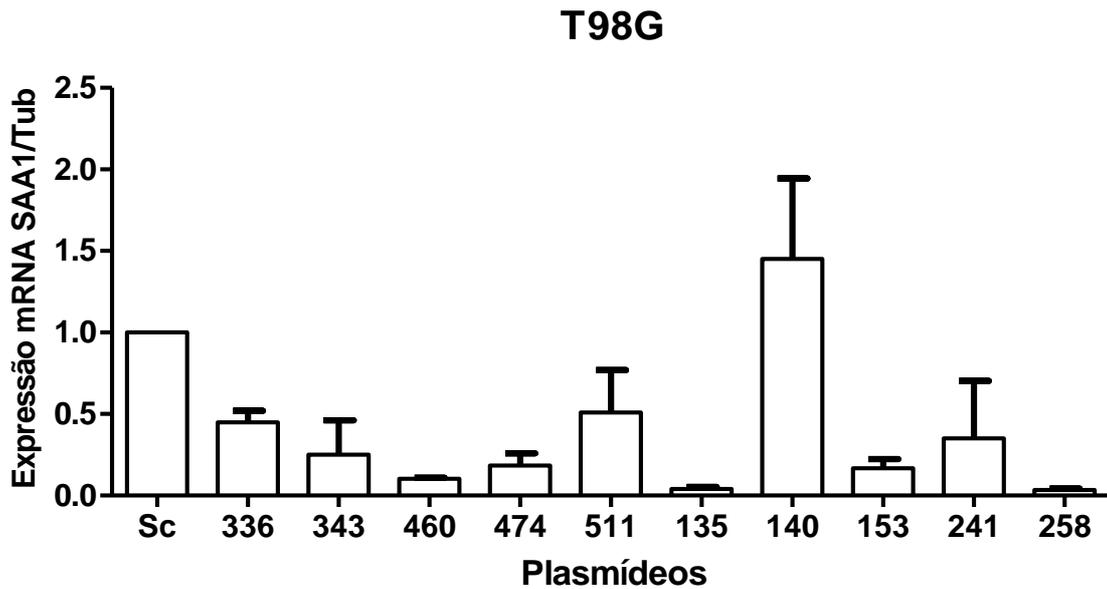


Figura 40: Transcrição de mRNA do gene SAA1 em células T98G silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA1/2. RT-PCR foi realizado para quantificação da supressão de mRNA do gene SAA1. Os plasmídeos 474, 511 e 140 não inibiram a transcrição de mRNA do gene SAA1. Os plasmídeos 474 e 140 não silenciaram o gene SAA1. Dados representam a média de três experimentos.

Quadro 6. Eficiência no silenciamento do gene SAA2 e efeito no crescimento em células T98G, usando diferentes plasmídeos para SAA1/2.

T98G					
shRNA	Plasmídeos comerciais Sigma	Nomenclatura usada no estudo	Blast	Eficiência <i>knockdown</i> Mrna	Efeito no crescimento*
SAA2	83048	460	SAA1/2	88%	Não
	83049	336	SAA1/2	50%	Redução
	83050	511	SAA1/2	0%	Não
	83051	474	SAA1	0%	Não
	83052	343	SAA1/2	40%	Redução
	154668	258	SAA1/2	94%	Redução
	154805	135	SAA1/2	0%	Redução
	155107	153	SAA1/2	50%	Não
	156029	241	SAA1/2	50%	Não
	156178	140	SAA1/2	0%	Não

*Análise qualitativa por microscopia.

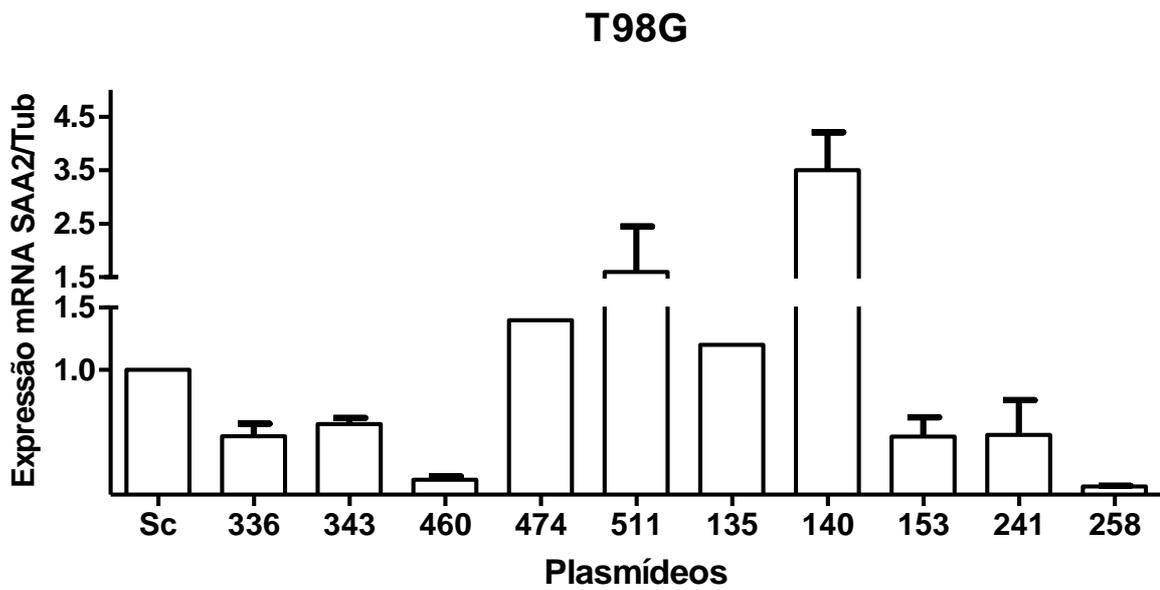


Figura 41: Transcrição de mRNA de SAA2 em células T98G silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA1/2. RT-PCR foi realizado para quantificação da supressão de mRNA do gene SAA2. Os plasmídeos 474, 511, 135 e 140 não inibiram a transcrição de mRNA do gene SAA2. Dados representam a média de três experimentos independentes.

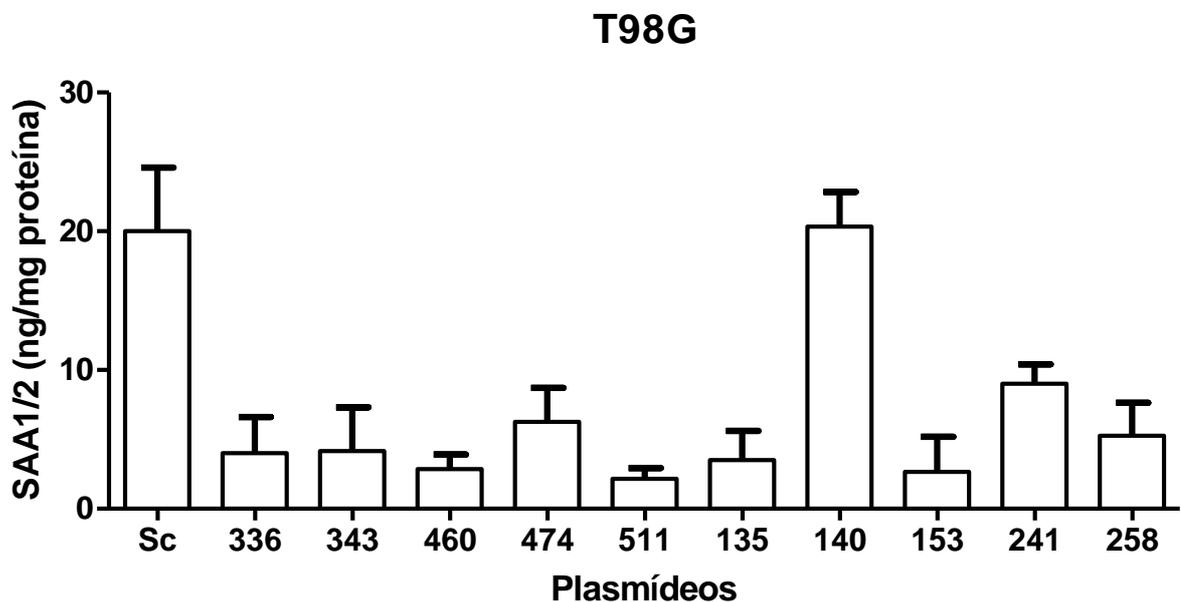


Figura 42: Produção da proteína SAA1/2 por células T98G. Quantificação da proteína SAA1/2 em células silenciadas utilizando diferentes plasmídeos foi realizada com kit de ELISA para SAA1/2. Dados representam a média de três experimentos.

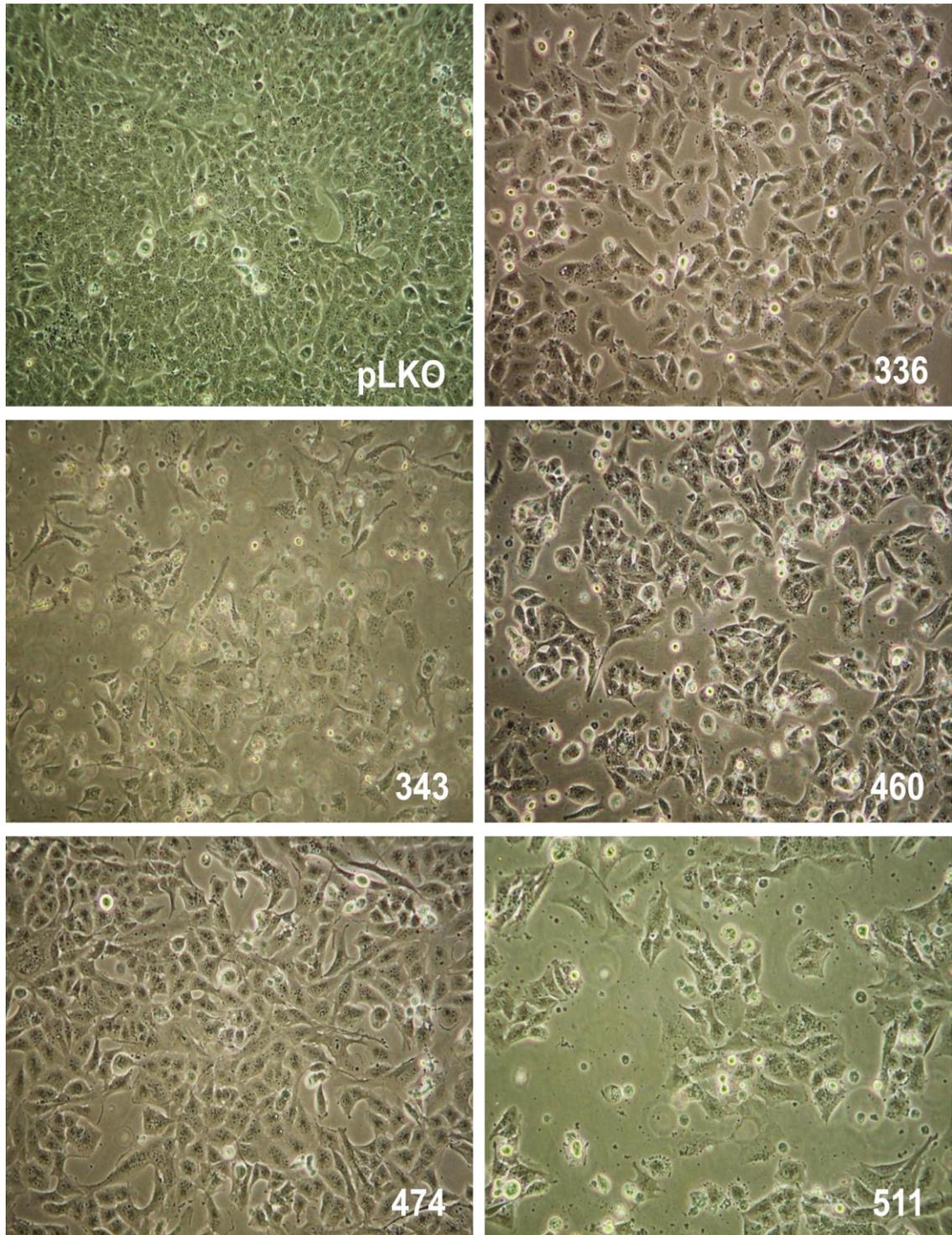


Figura 43: Aspecto morfológico da linhagem T98G durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2. Note que as células silenciadas com os clones 343 e 511 tiveram a viabilidade afetada. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de um experimento independente.

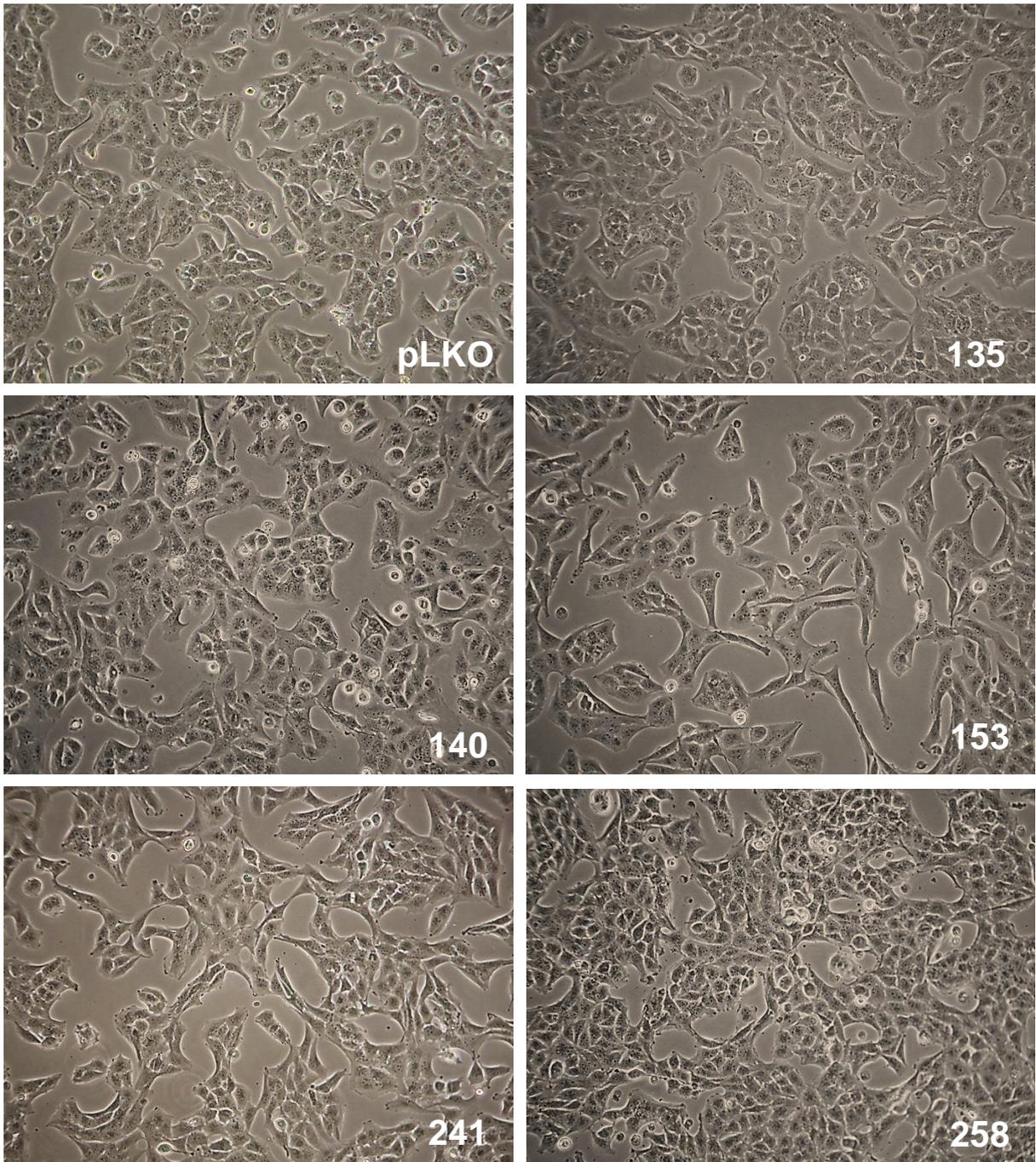


Figura 44: Aspecto morfológico da linhagem T98G durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA1/2. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de um experimento independente.

6.1.2 Knockdown de SAA4

A transfecção de plasmídeos shRNA para o gene SAA4 nas células A172 mostrou que os cinco plasmídeos utilizados suprimiram com uma eficiência de mais de 40% a transcrição de mRNA do gene SAA4 (**Quadro 7**). Células que

apresentaram inibição de mRNA para SAA4 maior que 70% parecem apresentar um menor crescimento das células e morfologia alterada (**Quadro 7**). A inibição na transcrição de mRNA (**Figura 45**) foi comprovada pela inibição na produção da proteína SAA4 por western blot (**Figura 47 e 48**). Os plasmídeos 290, 376 e 381 mostraram-se mais eficientes *knockdowns* para SAA4 (**Figuras 45, 46, 47 e 48**).

Quadro 7. Eficiência e efeitos observados após silenciamento do gene SAA4 usando diferentes plasmídeos em células A172

A172					
	Plasmídeos comerciais Sigma	Nomenclatura usada no estudo	Blast	Eficiência <i>knockdown</i> mRNA	Efeito no crescimento*
SAA4	156307	386	SAA4	57%	Não
	157214	381	SAA4	70%	Redução
	157385	376	SAA4	85%	Redução
	158185	290	SAA4	94%	Redução
	158302	293	SAA4	40%	Não

*Análise qualitativa por microscopia.

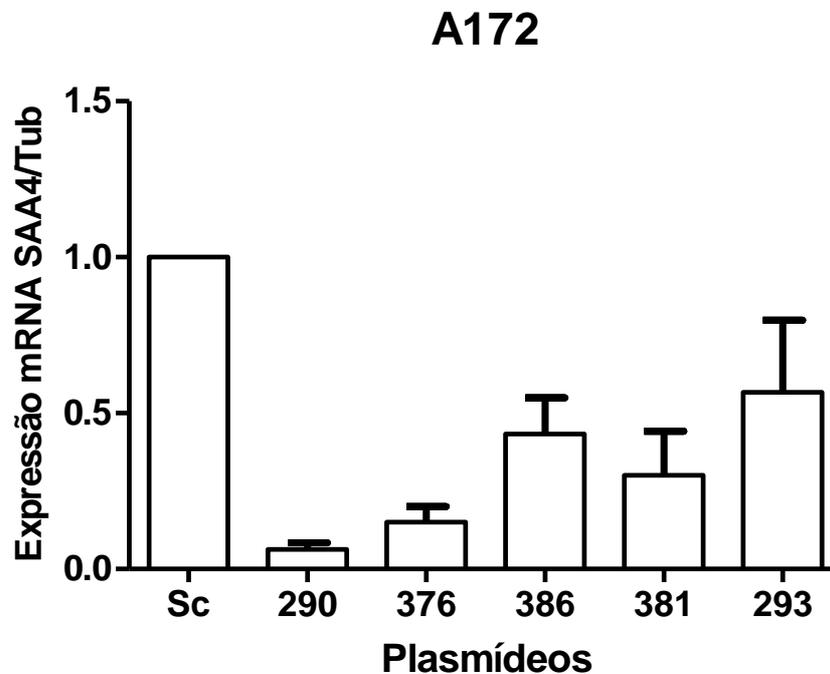


Figura 45: Transcrição de mRNA do gene SAA4 em células A172 silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA4. RT-PCR foi realizado para quantificação da supressão de transcrição de mRNA do gene SAA4. Os plasmídeos 290, 376 e 381

suprimiram o gene SAA4 mais eficientemente quando comparado com outros plasmídeos e scramble. Dados representam a média de três experimentos.

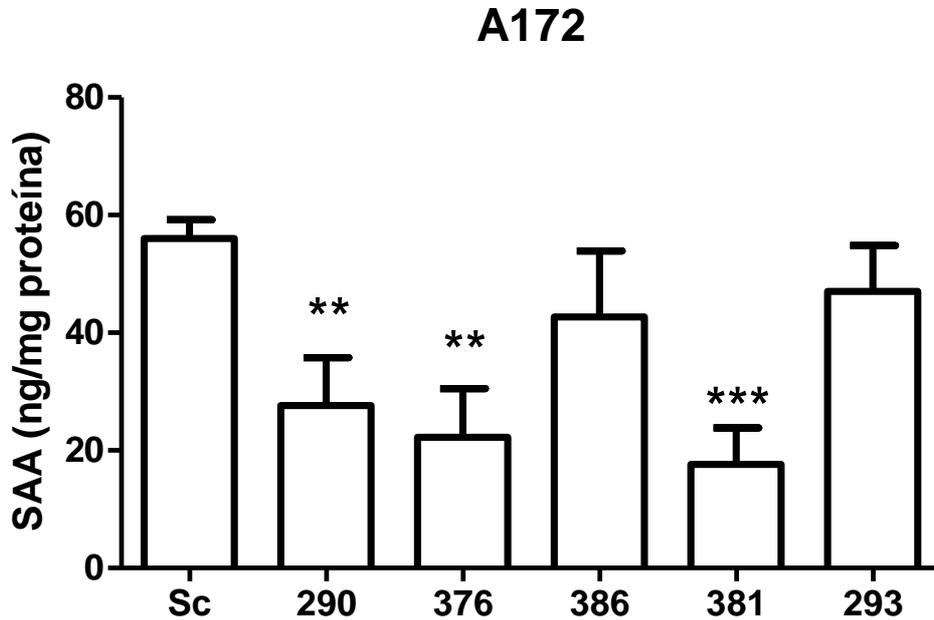


Figura 46: Inibição da produção de SAA nas células A172. A quantificação proteica de SAA foi realizada por kit de ELISA. Dados representam a média de três experimentos.

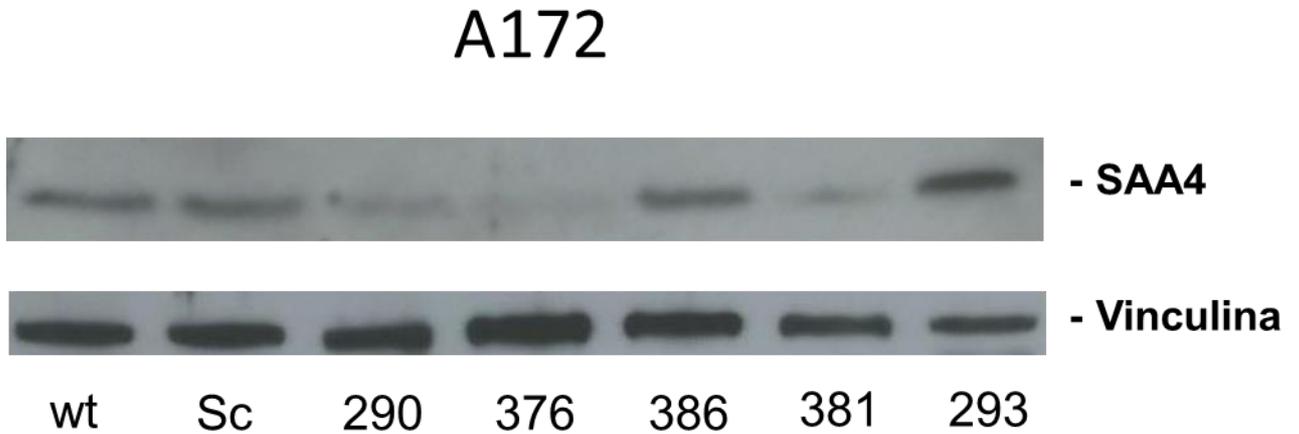


Figura 47: Imagem do western blot mostrando inibição da proteína SAA4 em células A172. Western blot foi realizado para confirmação da validação do silenciamento. A figura representa dois experimentos independentes.

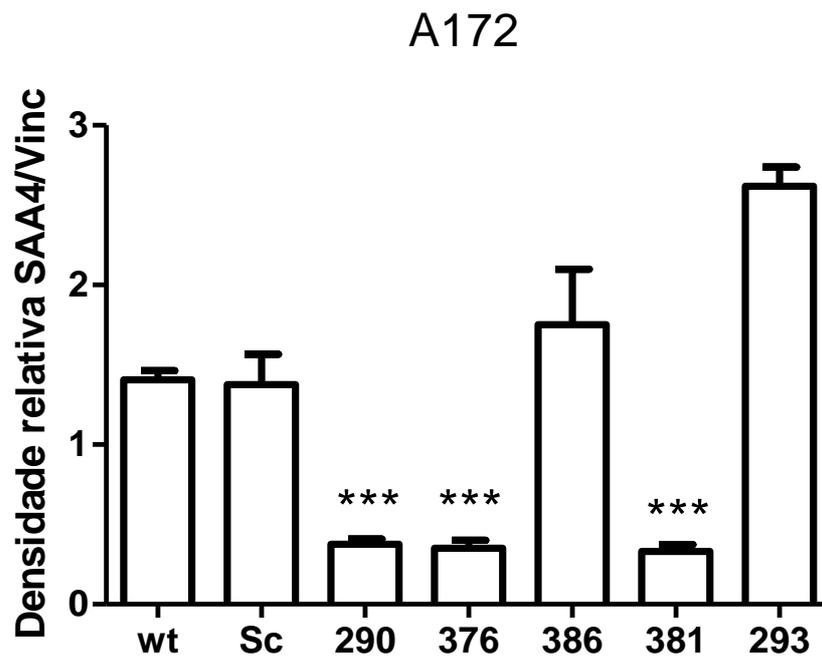


Figura 48: *Plasmídeos shRNA 290, 376 e 381 inibiram a proteína SAA4 em células A172. Western blot foi realizado para confirmação da validação do silenciamento e quantificação foi conduzida no software Image J. Os dados representam dois experimentos independentes.*

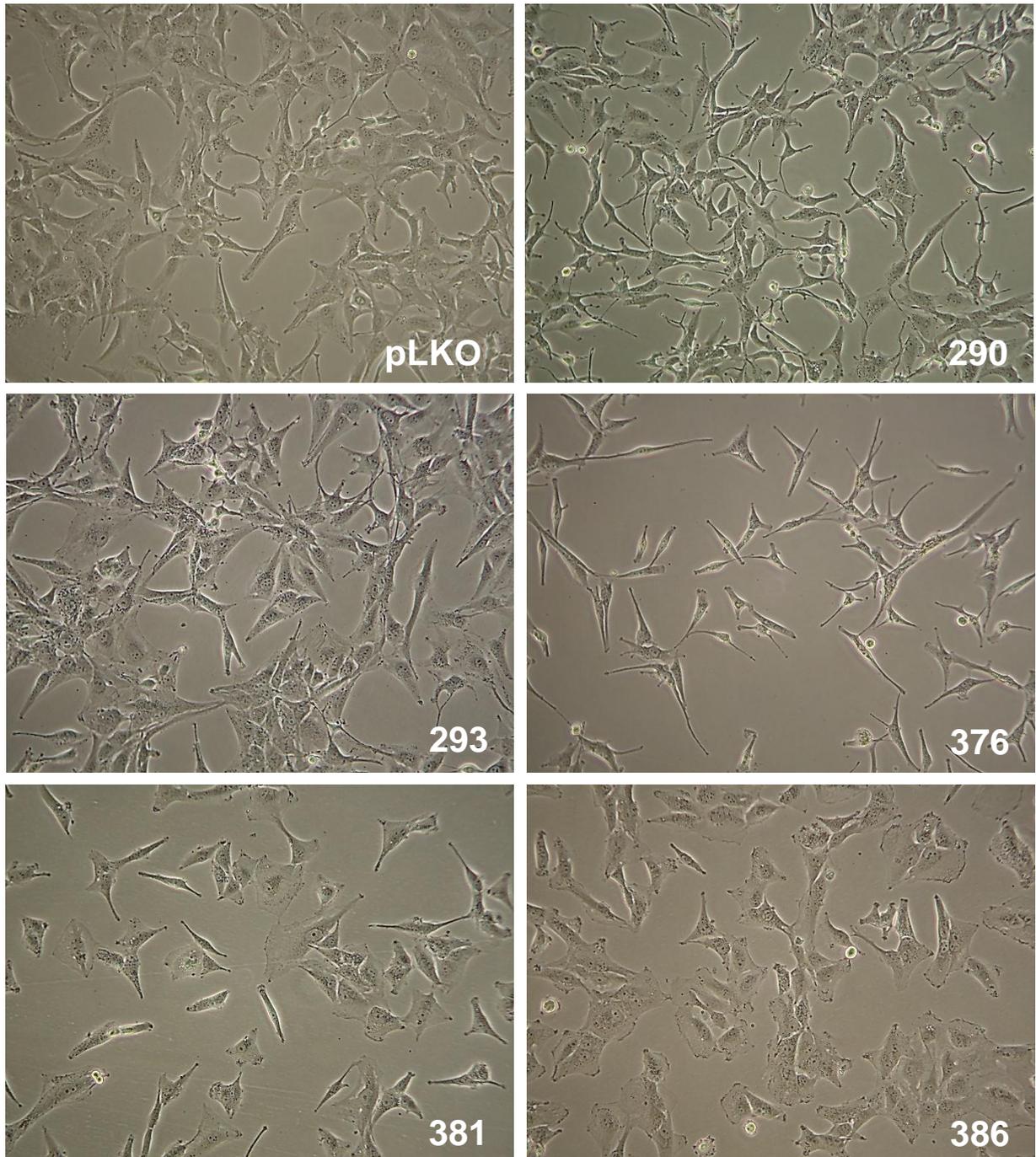


Figura 49: Aspecto morfológico da linhagem A172 durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos do gene SAA4. Note que as células silenciadas com o plasmídeo 376 adquiriram formato alongado se comparado ao controle que contém apenas o vetor pLKO. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de um experimento independente.

Para as células T98G, os plasmídeos 290 e 376 foram os mais eficientes em inibir transcrição de mRNA de SAA4 (**Quadro 8; Figura 50**). A inibição na

transcrição de mRNA foi comprovada pela inibição na produção da proteína SAA4 por *western blot* (Figuras 52 e 53).

Quadro 8. Eficiência e efeitos observados após silenciamento do gene SAA4 usando diferentes plasmídeos em células T98G

T98G					
	Plasmídeos comerciais Sigma	Nomenclatura usada no estudo	Blast	Eficiência <i>knockdown</i> mRNA	Efeito no crescimento*
SAA4	156307	386	SAA4	0%	Não
	157214	381	SAA4	0%	Não
	157385	376	SAA4	68%	Não
	158185	290	SAA4	72%	Redução
	158302	293	SAA4	30%	Não

*Análise qualitativa por microscopia.

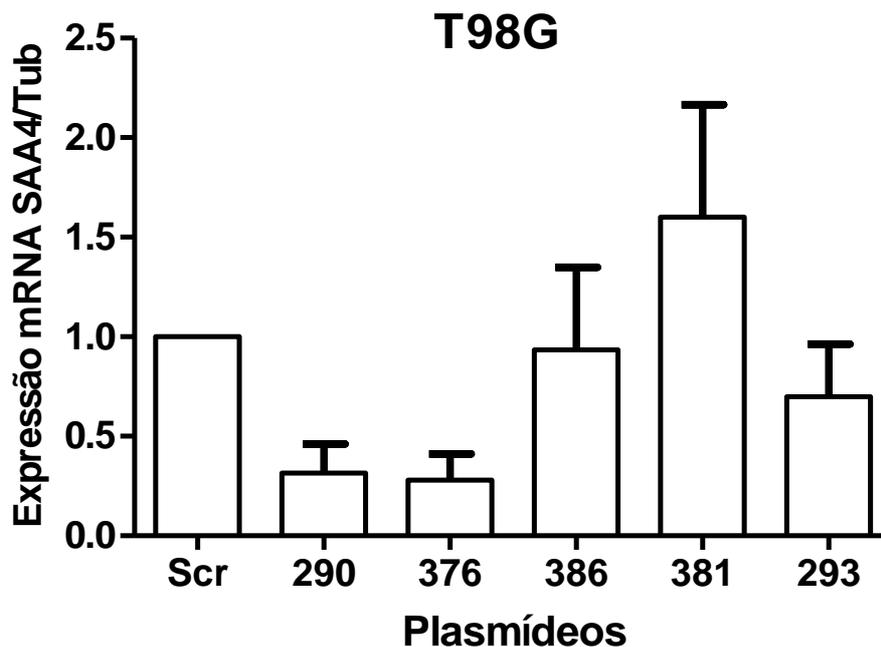


Figura 50: Transcrição de mRNA do gene SAA4 em células T98G silenciadas com diferentes plasmídeos shRNA para SAA4. RT-PCR foi realizado para quantificar a inibição da transcrição de mRNA do gene SAA4. Os plasmídeos 290 e 376 suprimiram o gene SAA4 mais eficientemente quando comparado com outros plasmídeos e scramble. Dados representam a média de três experimentos.

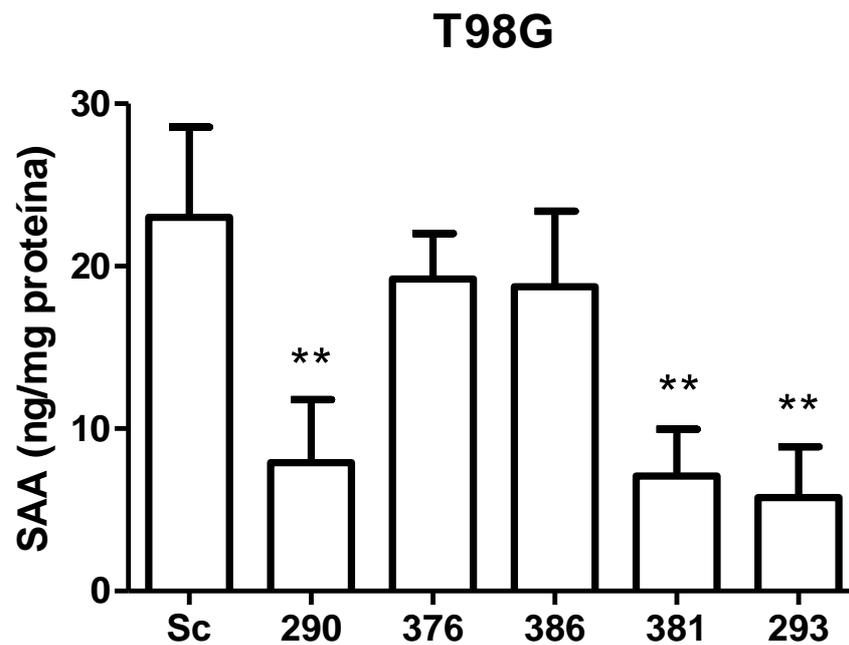


Figura 51: Inibição na produção de SAA nas células T98G. A quantificação proteica da SAA foi realizada por kit de ELISA. Dados representam a média de três experimentos.

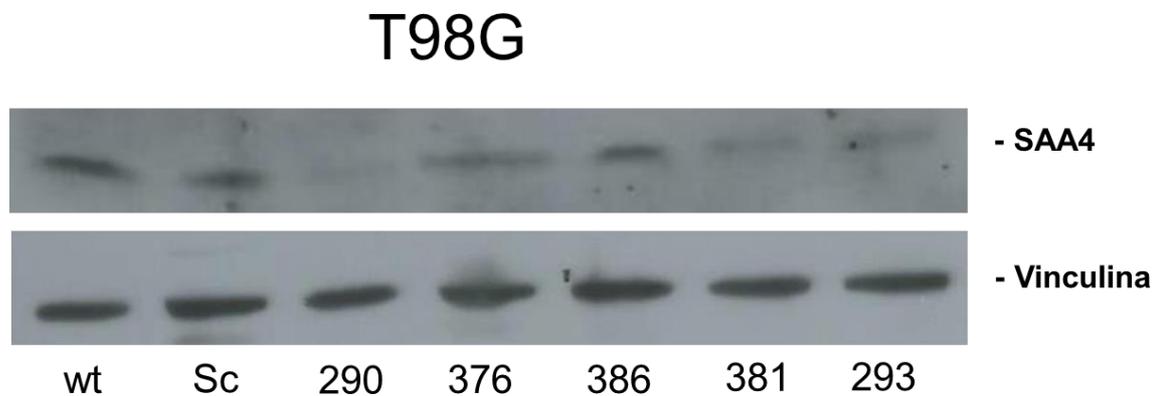


Figura 52: Imagem do western blot mostrando inibição da proteína SAA4 em células T98G. Western blot foi realizado para confirmação da validação do silenciamento do gene SAA4. A figura representa dois experimentos independentes.

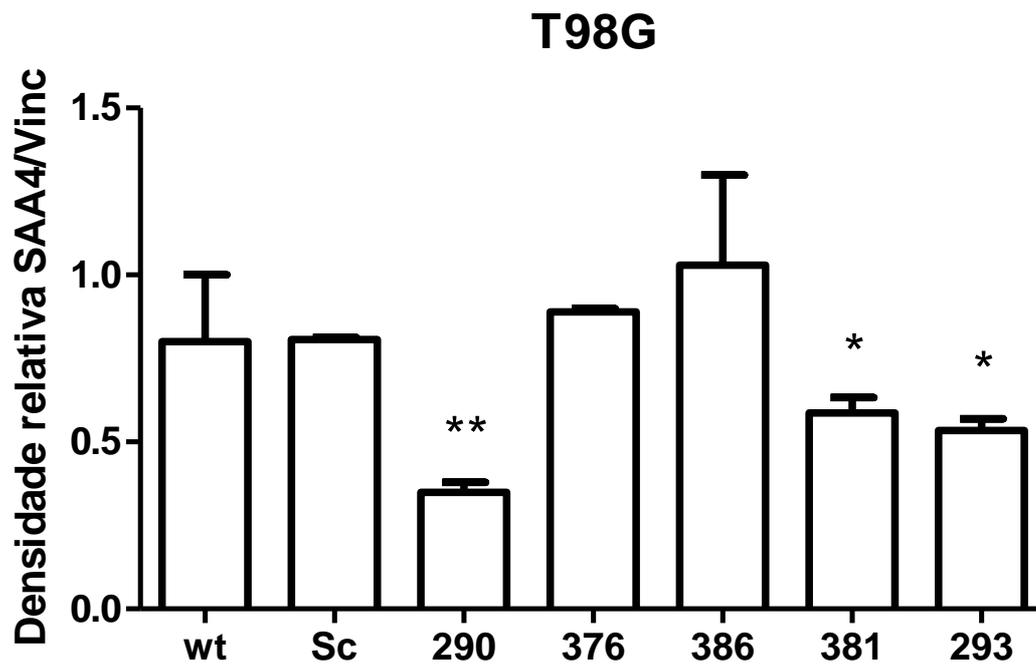


Figura 53: *Plasmídeos shRNA 290, 381 e 293 inibiram a proteína SAA4 em células T98G. Western blot foi realizado para confirmação da validação do silenciamento e quantificação foi realizada no software Image J. Os dados representam dois experimentos independentes.*

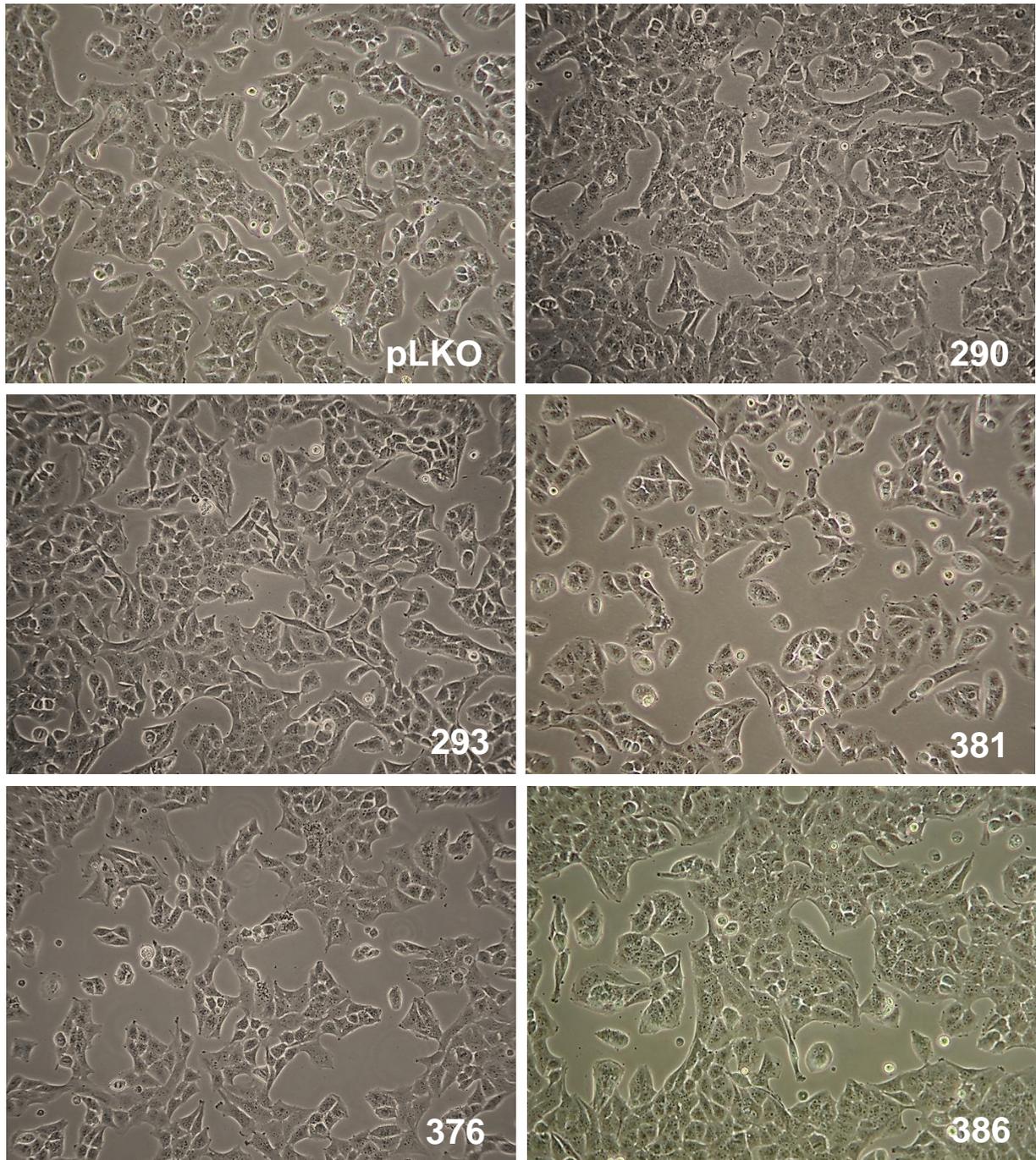


Figura 54: Aspecto morfológico da linhagem T98G durante silenciamento das células com diferentes plasmídeos shRNA do gene SAA4. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido Nikon com lente de aumento 200x e 2.4 de zoom óptico. As imagens são representativas de um experimento independente.

Considerando os dados obtidos com RT-PCR, kit de ELISA para SAA1/2 e western blot para SAA4 foi possível selecionar os plasmídeos que induziram maior inibição da transcrição de mRNA e de proteína para os diferentes genes da SAA considerando as duas linhagens, eles foram: 474 (SAA1), 336 (SAA1/2) e 290

(SAA4).

Como parte integrante da validação, investigamos se o vetor pLKO por si só poderia estar diminuindo a expressão de SAA. Se assim fosse, a inibição observada na expressão de SAA nos GBM após o silenciamento não seria um efeito exclusivo dos plasmídeos contendo a sequência shRNA dos genes de interesse e sim proveniente da técnica de transfecção (de inserção de um vetor). Portanto, realizamos RT-PCR e comparamos células wt, scramble (controle negativo - sequência não complementar a nenhuma seqüência de transcrito humano) e vetor vazio pLKO. Conforme pode ser observado nas Figuras 55 e 56, o vetor, bem como o *scramble* não interferiram na expressão dos diferentes genes da SAA se comparado às células wt, sugerindo que a inibição da expressão dos diferentes genes da SAA é efeito exclusivo das seqüências shRNA. Neste estudo nós utilizamos *scramble* (Sc) como controle para os *knockdowns* (KDs).

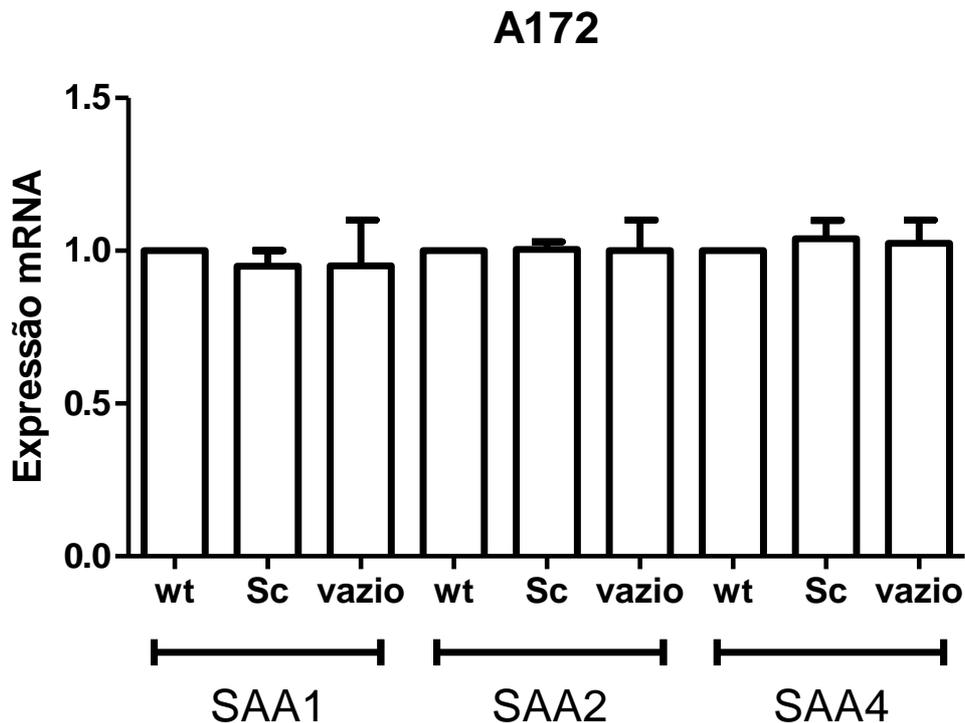


Figura 55: Células *scramble* e vetor pLKO não alteram a expressão dos diferentes genes da SAA em células A172 se compararmos às células wt. RT-PCR foi realizado para verificar a expressão dos diferentes genes da SAA em células wt, *scramble* e vetor pLKO vazio. Dados representam dois experimentos.

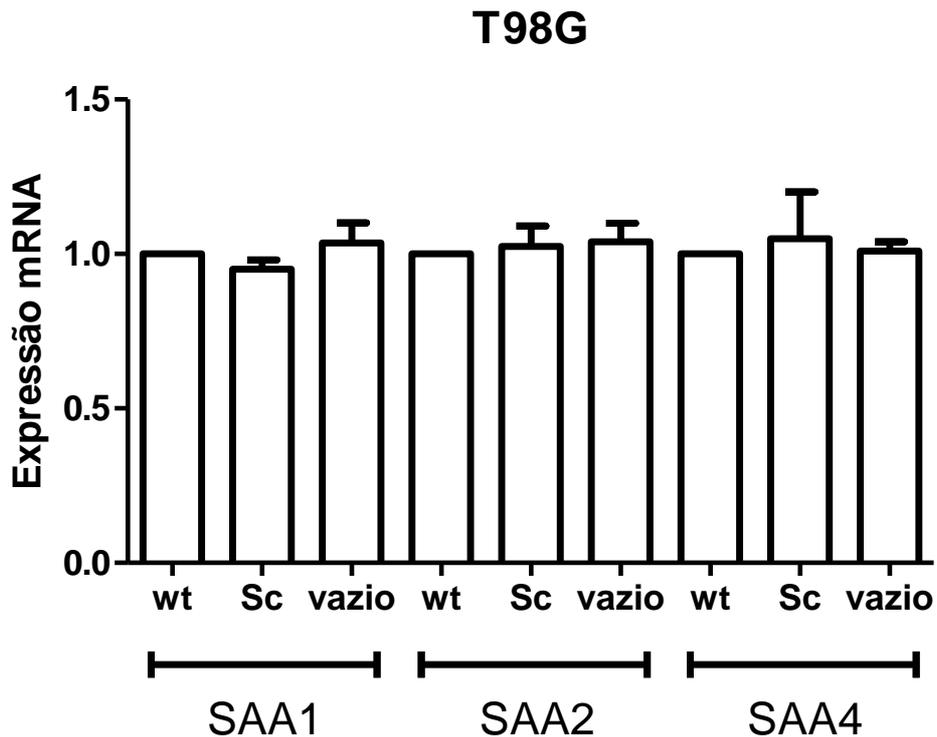


Figura 56: Células *scramble* e vetor *pLKO* não alteram a expressão dos diferentes genes da SAA em células T98G se compararmos às células *wt*. RT-PCR foi realizado para verificar a expressão dos diferentes genes da SAA em células *wt*, *scramble* e vetor *pLKO* vazio. Dados representam dois experimentos.

Com o objetivo de comprovarmos que o silenciamento realmente não modifica a célula, realizamos como ensaio adicional, o ensaio de proliferação por incorporação de timidina, cuja resposta já é conhecida (Knebel, et al. 2013). A realização deste ensaio nos permitiu observar que células controle (*scramble*) silenciadas preservam o padrão de resposta de células *wt* (**Figura 57**).

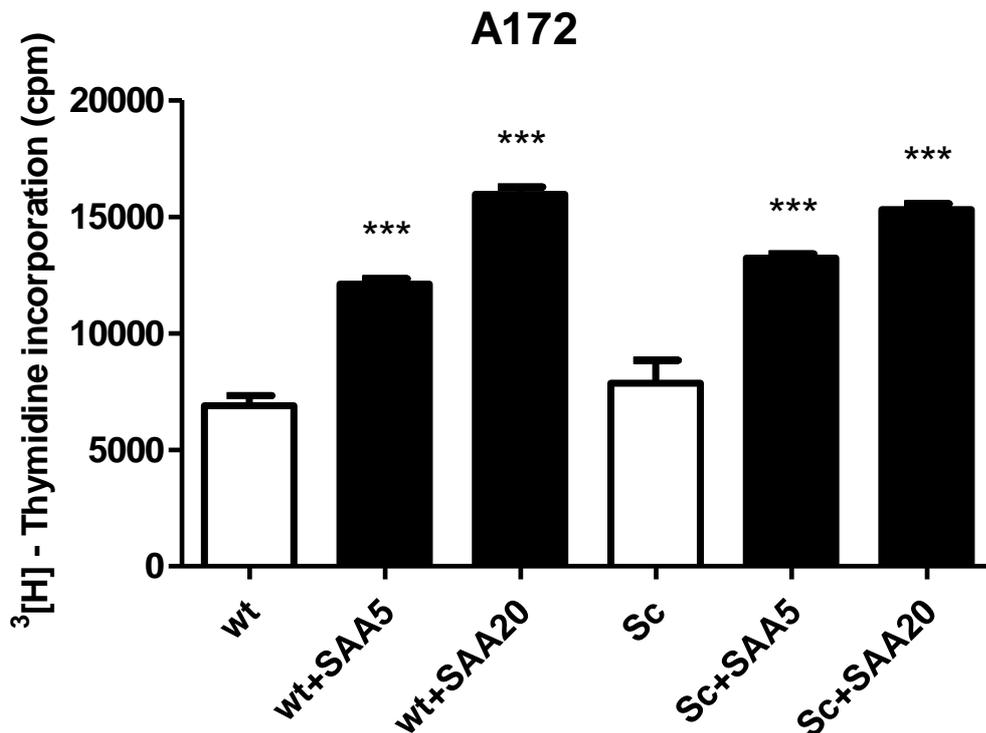


Figura 57: Células A172 scramble apresentaram o mesmo padrão de resposta proliferativo observado para células A172 wt quando induzidas por rSAA. Ensaio de incorporação de timidina foi realizado para análise da proliferação celular. Dados representam dois experimentos.

6.2 Efeitos dos Knockdowns SAA1, SAA1/2 e SAA4 em células A172

6.2.1 rSAA aumenta a transcrição de SAA1, SAA2 e SAA4 em células controle, enquanto em células knockdowns a transcrição de SAA foi prejudicada

Nosso grupo de pesquisa já havia mostrado pela primeira vez que rSAA é capaz de regular positivamente sua própria transcrição em células de adipócitos 3T3-L1 (Fillipin-Monteiro et al., 2011). Posteriormente, este efeito foi reiterado em linhagem celular de adenocarcinoma de camundongo (Hansen et al., 2014). Neste estudo nós mostramos que rSAA estimula a transcrição de todos os genes da SAA, inclusive o gene constitutivo SAA4 (**Figura 58 A**). Nas células A172, 20 µg/mL de rSAA induziu aproximadamente 2 vezes mais o gene SAA1 que seu controle, enquanto SAA2 foi induzido aproximadamente 5 vezes e SAA4 4.5 vezes quando comparado às concentrações basais observadas na célula (**Figura 58 A**). Estes resultados mostram que SAA produzida por outros processos inflamatórios pode

desenvolver mecanismos parácrinos sobre o tumor, dentre estes, a regulação da sua própria transcrição, induzindo a produção endógena de mais SAA e impactando assim na progressão do mesmo.

Para entendermos melhor os mecanismos de ação da SAA no microambiente do tumor, realizamos Knockdown de todos os genes da SAA. Em células A172, o KD de SAA1 inibiu 55% a transcrição de SAA1, mas aumentou a transcrição de SAA2 e SAA4 aproximadamente 2 vezes (**Figura 58 A**). Células KD para SAA1 quando estimuladas com 20 µg/mL de rSAA aumentaram a transcrição de SAA1 aproximadamente 3,5 vezes, e de SAA2 e SAA4 aproximadamente 2 vezes (**Figura 58 A**). O knockdown de SAA1/2 inibiu 60% o gene SAA1 e 56% o gene SAA2 e não afetou a transcrição de SAA4. O tratamento do KD de SAA1/2 com rSAA foi capaz de induzir aumento de aproximadamente 5 vezes apenas na transcrição de SAA2, os demais genes não responderam a rSAA (**Figura 58 A**). O knockdown de SAA4 inibiu 80% a transcrição de SAA4, 50% de SAA1 e SAA2. KD de SAA4 não responde ao tratamento com 20 µg/mL de rSAA (**Figura 58 A**). Neste caso, estes resultados sugerem que expressão constitutiva de SAA4 parece ser essencial para a transcrição de SAA1 e SAA2.

A avaliação das concentrações proteicas de SAA nos KDs foi realizada com kit de ELISA e western blot para a proteína SAA4. A análise proteica através de kit de ELISA permitiu constatar que KD para SAA1 inibiu 50% a expressão de SAA, KD para SAA1/2 inibiu 76% SAA e KD para SAA4 inibiu 38% a expressão de SAA (**Figura 58 B**). Em contrapartida, o western blot utilizando anticorpo anti-SAA4 permitiu verificar que apesar do KD de SAA1 ter induzido transcrição de SAA4, este aumento não se reflete na expressão de proteína (**Figura 58 C**). O KD de SAA1/2 não induziu inibição de SAA4 e o KD de SAA4 induziu inibição de 72% de proteína SAA4 (**Figura 58 C**). A análise proteica em conjunto com o PCR-RT permitiu constatar que apresentamos um KD para SAA1, com 50% de inibição e um KD para SAA1/2 com 76% de inibição, ambos apresentam SAA4 preservada e o terceiro KD apresentou 72% de inibição de SAA4 e 50% de inibição de SAA1/2.

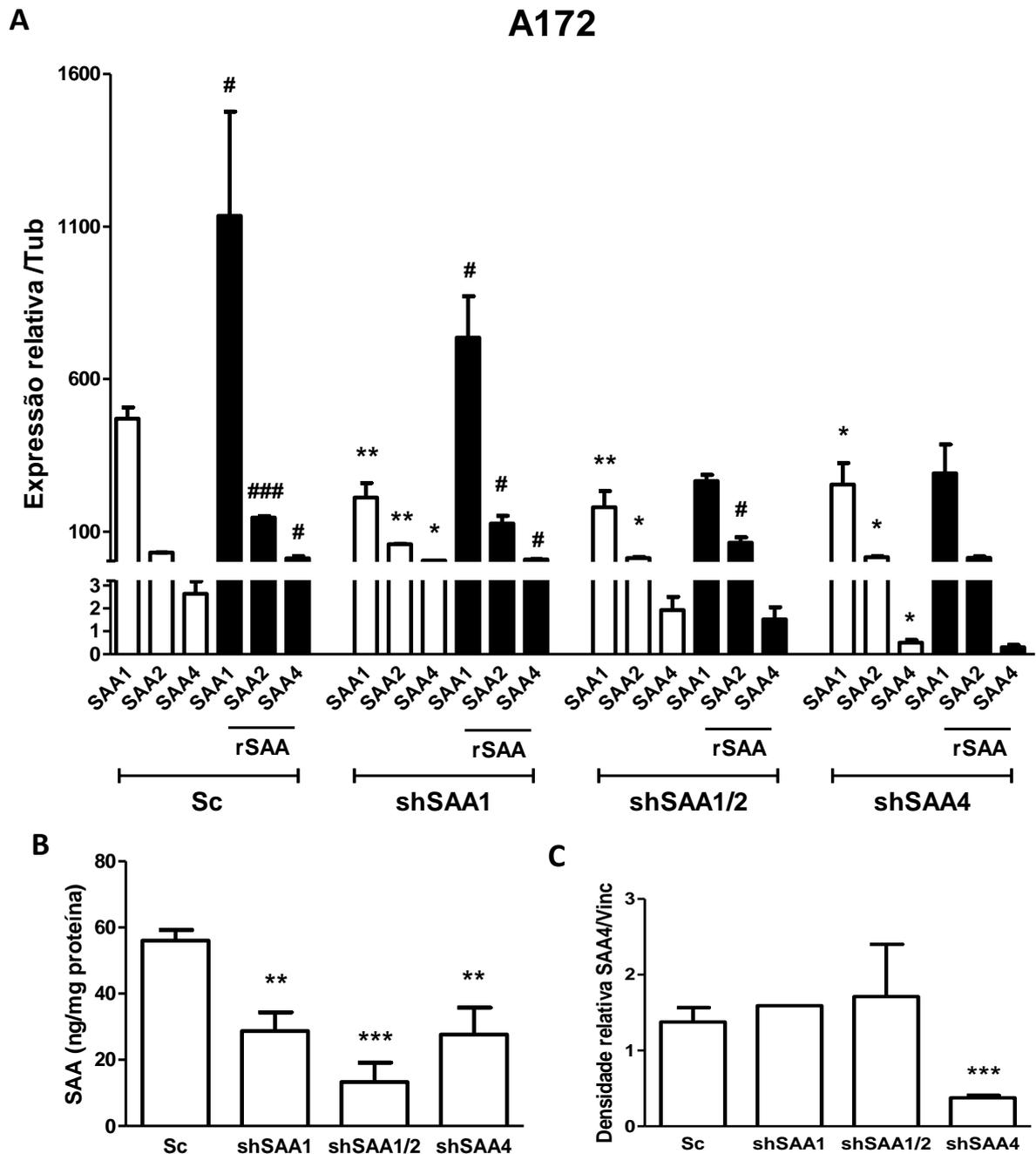


Figura 58: rSAA induz aumento da transcrição de todos genes da SAA em células A172. RT-PCR (A) foi realizado para investigação da indução por rSAA da transcrição dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 em células controle e KDs. Knockdowns de SAA respondem parcialmente a indução de rSAA (A). Kit de ELISA (B) e western blot (C) foram utilizados para avaliação da especificidade dos KDs em relação aos demais genes da SAA. Dados representam três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado aos respectivos KDs não estimulados com rSAA.

O fato de células A172 terem a transcrição de todos os genes da SAA aumentados quando tratadas com rSAA nos fez questionar se o tratamento de células controle e KDs SAA1 e SAA2 quando estimulados com rSAA poderiam

induzir a expressão de SAA4. Por este motivo realizamos western blot de células controle e KDs e verificamos que o estímulo das mesmas com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rSAA por 12h induz aumento de aproximadamente 1,7 vezes na expressão de SAA4 (**Figuras 59 A e B**). Neste caso, podemos sugerir que a expressão de SAA4 parece ser independente da expressão de SAA1 e 2, uma vez que células A172 com prejuízo na expressão de SAA1 e SAA1/2, mas que mantêm expressão de SAA4 preservada foram capazes de responder a rSAA aumentando SAA4 (**Figura 59 A e B**).

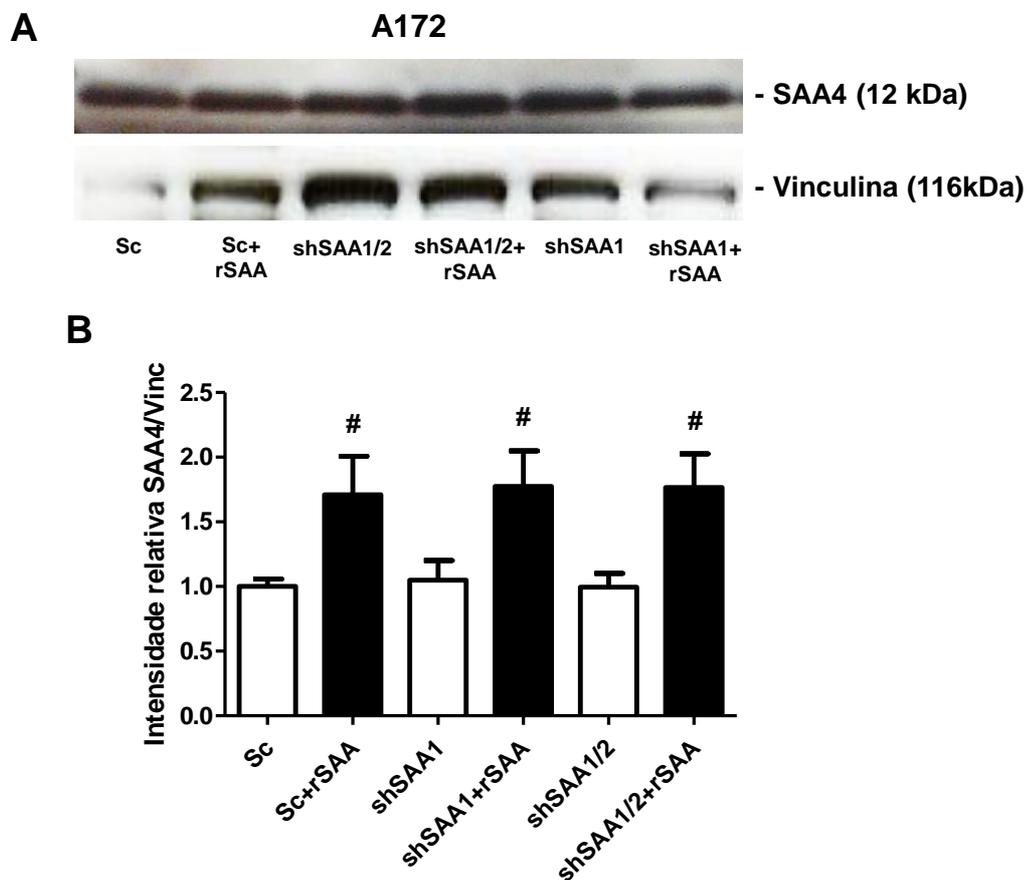


Figura 59: rSAA aumenta a expressão de SAA4 em células controle e KDs para SAA1 e SAA1/2 em A172. Células foram estimuladas com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rSAA por 12 h e lisadas com tampão RIPA e inibidor de protease, quantificadas por Bradford e 40 μg de proteína total submetida a eletroforese (**A**). Western blot foi quantificado no software Image J (**B**). A imagem é representativa de dois experimentos.

6.2.2 Knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 inibem a proliferação de A172

Ensaio de incorporação de timidina foi realizado para avaliarmos o efeito dos diferentes knockdowns para SAA na proliferação de células A172. Já descrevemos

que células A172 expressam os genes SAA1, SAA2 e SAA4 e são capazes de produzir SAA, entretanto, a mesma parece não ser excretada no meio extracelular e por este motivo consideramos a existência de um efeito intrácrico. Além disso, estas células respondem à adição de rSAA aumentando a proliferação das mesmas (Knebel et al., 2013). Porém, não era sabido se o aumento na proliferação destas células pode ser resultado da SAA produzida endogenamente pelo tumor e/ou dependente também da SAA produzida por processos inflamatórios.

A realização dos knockdowns dos diferentes genes da SAA permitiu observar que todos KDs foram capazes de inibir a proliferação de células A172. Entretanto, a proliferação não foi recuperada com a adição de rSAA. Apenas foi observado um pequeno aumento na proliferação dos KDs SAA1 e SAA1/2 quando rSAA foi adicionada (**Figura 60**). KD de SAA4 mostrou induzir maior inibição da proliferação destas células e não responde ao estímulo por rSAA.

Estes achados sugerem que SAA4 parece ser um gene extremamente importante para a proliferação celular de tal maneira que o tratamento com rSAA é incapaz de promover aumento de proliferação quando o mesmo for pouco expresso. Além disso, SAA produzida por processos inflamatórios parece apresentar um maior impacto sobre a proliferação de tumores se os mesmos expressarem SAA, principalmente SAA4. De qualquer maneira a SAA produzida pelo próprio tumor parece ser mais importante para a manutenção do mesmo do que a proveniente de processos inflamatórios existentes no organismo concomitante ao tumor.

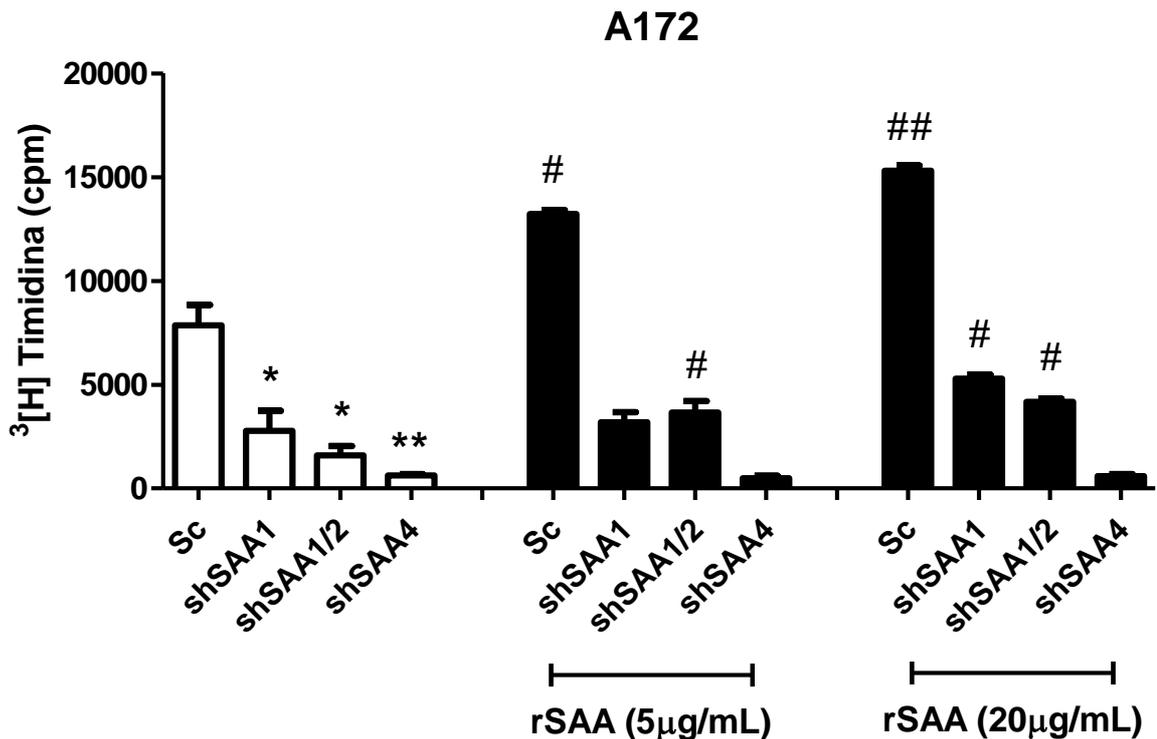


Figura 60: Knockdowns dos genes SAA1/2 e SAA4 inibem proliferação das células A172. Quando SAA foi adicionada às células houve restabelecimento de seu comportamento proliferativo normal. $1,0 \times 10^4$ cells/mL foram cultivadas e quando alcançaram 70% de confluência foram sincronizadas por 48h em DMEM 0,5% FBS e estimuladas ou não com 5 ou 20 µg/mL de rSAA por 48 h. ^3H timidina foi adicionada às células 18 h antes de completar 48 h de tratamento com rSAA. Proliferação celular foi realizada usando um contador de cintilação. Dados representam a média de três experimentos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus scramble; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ versus KD não estimulado com rSAA.

Considerando que rSAA aumenta a proliferação de células A172 e que os KDs de SAA1, SAA1/2 e SAA4 inibem a proliferação, realizamos western blot de células controle e KDs estimulados e não estimulados com 20 µg/mL de rSAA e avaliamos a possibilidade da supressão de SAA através dos *knockdowns* afetarem a fosforilação de ERK1/2, bem como a capacidade de rSAA fosforilar a proteína ERK1/2 em células controle e KDs. Se observarmos as Figuras 61 e 62, primeiramente realizamos a quantificação da fosforilação de ERK1/2 normalizando a expressão do mesmo em relação ao controle endógeno (vinculina) e verificamos que o tratamento de 12 h com rSAA aumenta a fosforilação de ERK1/2.

Entretanto, o fato da banda de ERK total do KD para SAA4 tratado com rSAA ter apresentado expressão diminuída, realizamos quantificação da razão de expressão de ERK fosforilado por ERK total e observamos uma tendência ao aumento na fosforilação de ERK1/2 em células controle (*scramble*) quando tratadas

com rSAA, enquanto *knockdowns* continuaram a apresentar diminuição na fosforilação de ERK1/2 e não recuperaram a fosforilação quando tratadas com rSAA (**Figura 63**). Apesar da análise por western blot ser inconclusiva para sugerirmos o envolvimento de ER1/2 na proliferação de células A172, o ensaio de incorporação de timidina com células A172 wt, usando o inibidor PD98059 mostrou inibição de proliferação destas células quando tratadas com rSAA por 48 h (**Figura 24**) e permitiu assim sugerir o envolvimento de ERK1/2 na proliferação induzida por rSAA em células A172.

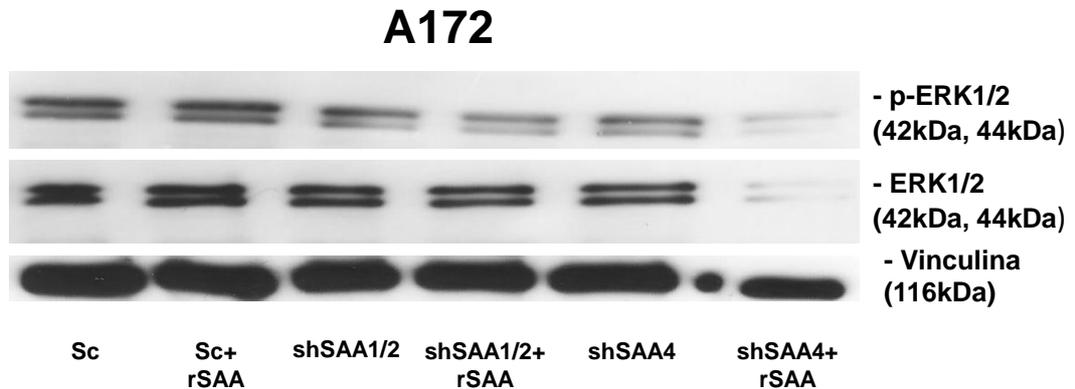


Figura 61: *Knockdowns* da SAA apresentaram prejuízo na fosforilação de ERK1/2 em células A172. Western blot foi realizado para avaliação da fosforilação de ERK1/2. O tratamento das células com rSAA por 12 h não recupera a fosforilação de ERK1/2. A imagem representa dois experimentos independentes.

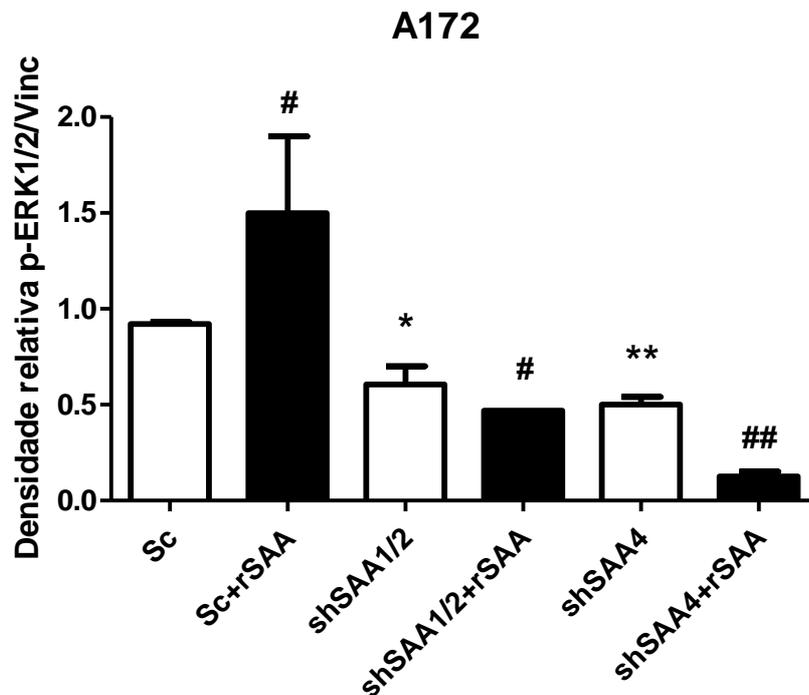


Figura 62: rSAA aumenta a fosforilação de ERK1/2, enquanto KDs de SAA apresentam prejuízo na fosforilação de ERK1/2. Western blot foi realizado para avaliação da fosforilação

de ERK1/2. O tratamento das células com rSAA por 12 h não recupera a fosforilação de ERK1/2. Intensidade de fosforilação foi normalizada em relação ao controle endógeno vinculina. A figura representa dois experimentos independentes.

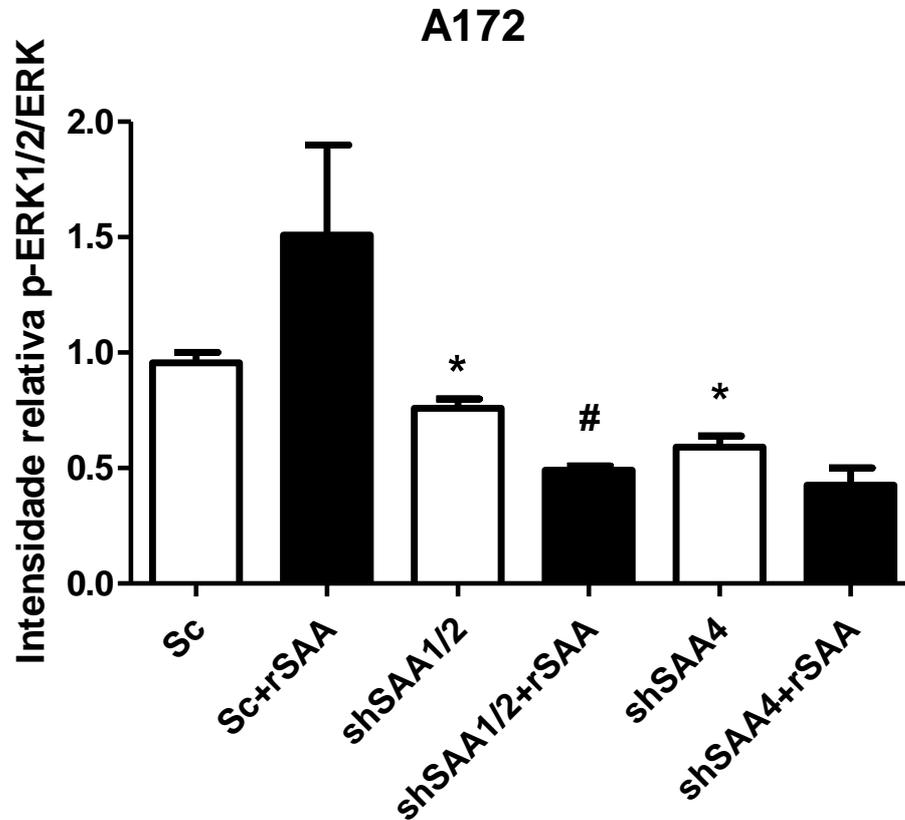


Figura 63: Knockdowns da SAA prejudicam a fosforilação de ERK1/2. Western blot foi realizado para avaliação da fosforilação de ERK1/2 em células controle e KDs. Intensidade de fosforilação foi normalizada em relação a expressão de ERK total. O tratamento das células com rSAA por 12 h mostrou uma tendência de indução da fosforilação de ERK1/2 em células controle, enquanto células KDs apresentaram diminuição da fosforilação, a qual não foi recuperada pela adição de rSAA. A figura representa dois experimentos independentes.

6.3 Células A172 KDs para SAA1, SAA1/2 e SAA4 migram e invadem menos

Nós já havíamos mostrado que rSAA diminui migração e invasão de células A172 (Knebel et al., 2013). Neste estudo nós realizamos ensaio de migração por *scratch test* e marcação do citoesqueleto celular com faloidina e, de invasão por *trans well* com células KDs para os diferentes genes da SAA e encontramos que SAA endógena parece ser importante para a manutenção do tumor, enquanto rSAA inibe migração e invasão de células A172.

O ensaio por *scratch test* permitiu observar que *knockdowns* para SAA1, SAA1/2 e SAA4 inibiram a migração de células A172 quando comparadas ao

controle. KD de SAA1 inibiu aproximadamente 43% a migração, enquanto KD de SAA1/2 inibiu 32% e KD de SAA4 inibiu aproximadamente 50% a migração de células A172. A adição de 20 µg/mL de rSAA não teve efeito na migração dos KDs (**Figuras 64 e 65**). Estes resultados sugerem que SAA 1, 2 e 4 produzidas pelo glioma são importantes para a migração de células A172, entretanto quando adicionamos rSAA não observamos maior inibição desta migração. Podemos sugerir que provavelmente as células precisam ter uma expressão ótima de SAA para responder a rSAA.

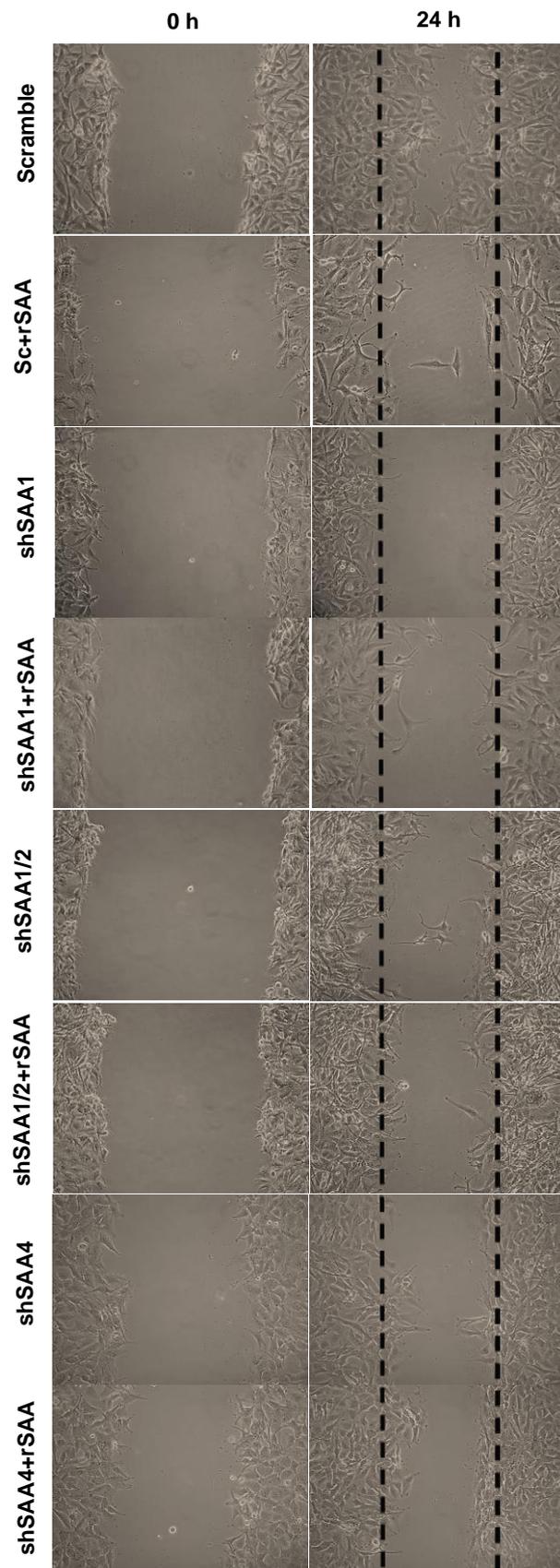


Figura 64: *Imagens mostram que knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 afetam a migração das células A172. Scratch test foi realizado para determinação do percentual de área migrada pelos KDs de SAA comparado ao controle estimulados ou não com rSAA por 24h.*

Os KDs não responderam a adição de 20 µg/mL de rSAA. As imagens foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico. As fotos são representativas de três experimentos independentes.

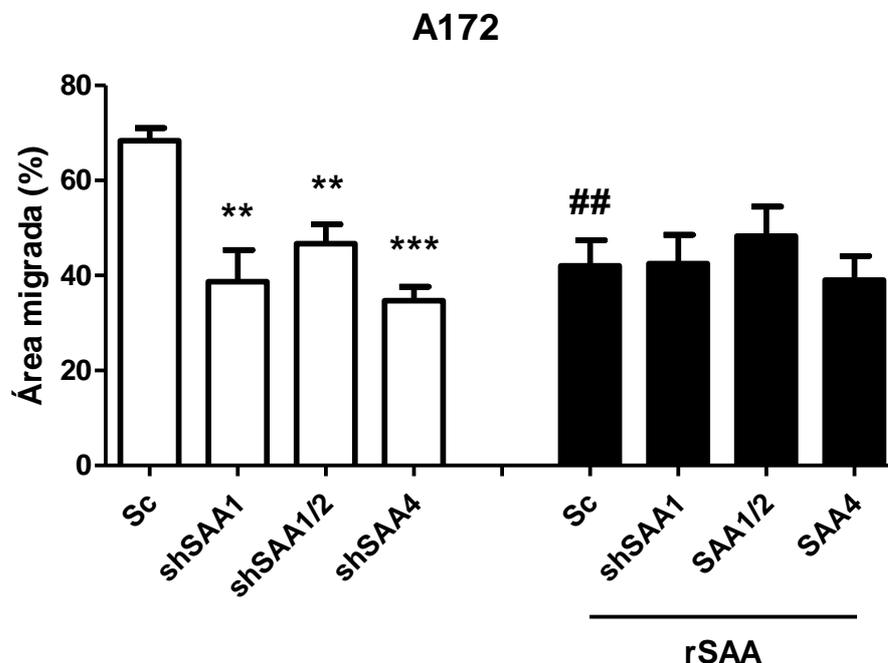


Figura 65: knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 afetam a migração das células A172. Scratch test foi realizado para determinação do percentual de área migrada pelos KDs de SAA comparado ao controle estimulados ou não com rSAA por 24h. Os KDs não responderam a adição de 20 µg/mL de rSAA. Quantificação da área migrada foi analisada no software Axio Vision. Dados representam a média de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle. ## $p < 0,01$ quando comparado aos respectivos KDs não estimulados com rSAA.

Realizamos microscopia imunofluorescente para avaliar o papel da SAA no fenótipo migratório e na organização do citoesqueleto de actina. Conforme podemos observar (**Figura 66**) células controle apresentam forma poligonal, semelhante a fibroblastos e volume citoplasmático normal. Quando rSAA foi adicionada às células controle, as mesmas apresentaram aumento dos processos celulares (prolongamentos que a célula emite) e formação de filopódios. Células KD para SAA1 e SAA4 apresentaram contração celular, diminuição do corpo celular, aumento no número de adesões celulares, perda de direção de migração e aumento de filopódios (**Figura 66**).

Células KD SAA1/2 mantiveram o formato poligonal como o controle, entretanto apresentaram mais adesões que estas (**Figura 66**). Mesmo assim, o número de adesões formadas foi menor que dos demais KDs. O conjunto de

alterações observadas no citoesqueleto celular dos diferentes KDs sugere inibição da migração, conforme já observamos no ensaio de *scratch test* (**Figuras 64 e 65**). Quando rSAA foi adicionada aos KDs, as células KD para SAA1, SAA1/2 e SAA4 passaram a apresentar morfologia semelhante às células controle tratadas com rSAA, reduziram a formação de adesão focal, bem como a contração celular (**Figura 66**), entretanto, não houve recuperação total do fenótipo celular. Estes dados sugerem que SAA é importante para a manutenção da morfologia celular de células A172, sendo que parece existir um nível ótimo basal de SAA na célula para que a mesma possa manter o seu formato poligonal e o fenótipo migratório.

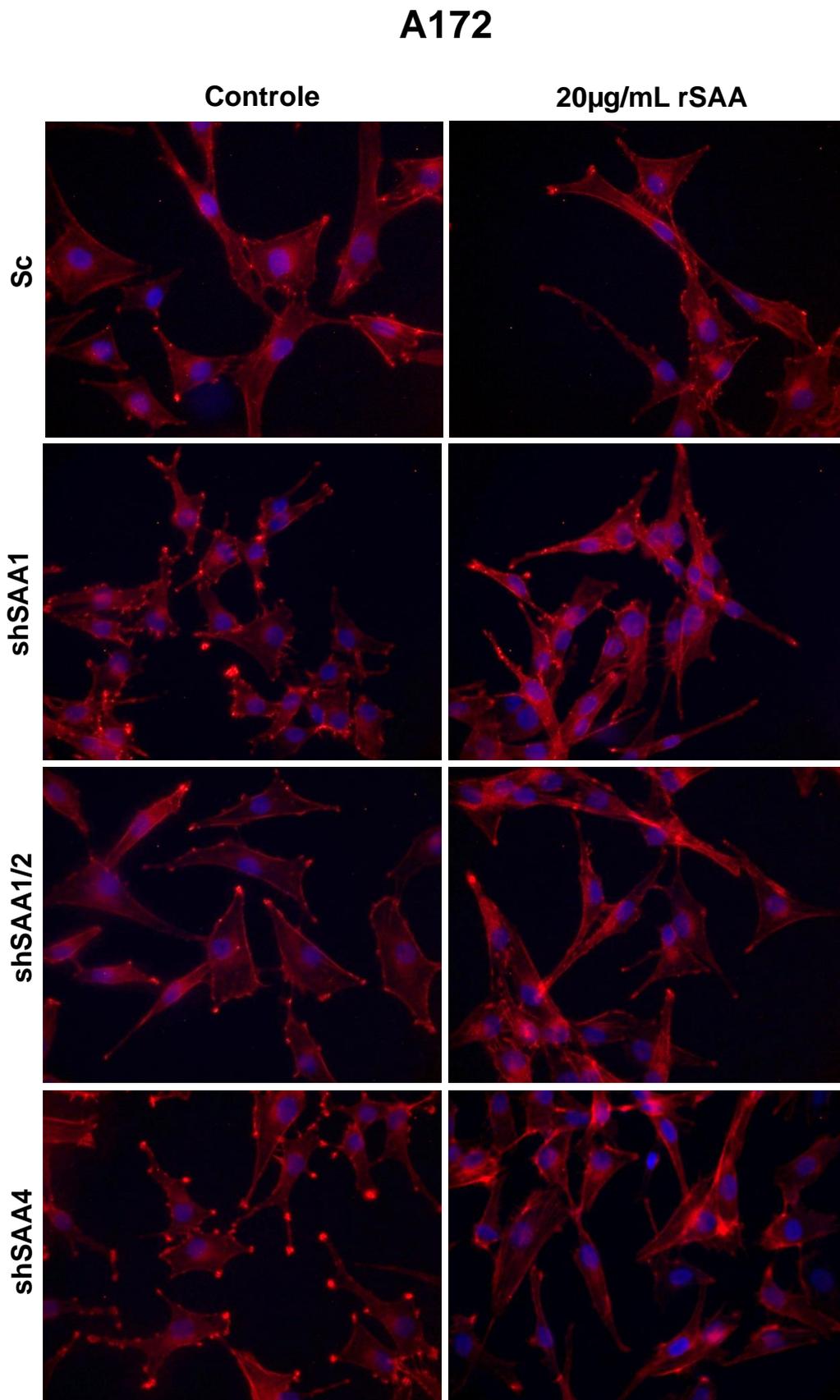


Figura 66: KDs de SAA1, SAA1/2 e SAA4 induzem reorganização do citoesqueleto de actina de células A172. Células controle e KDs para SAA foram tratadas por 24h com 20 μ g/mL de rSAA em meio DMEM com 0,5% de SFB, em seguida fixadas, permeabilizadas e

marcadas com faloidina para visualização da organização dos filamentos de actina. Fotos foram adquiridas utilizando o software Nis Elements e microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse 80i, com lente de aumento 400x.

Similarmente a SAA, uma glicoproteína denominada SLIT2, a qual tem sido associada à modulação da migração de neurônios mostrou inibir migração e invasão de gliomas por inativação de cdc42-GTP (Xu et al., 2010). SAA também parece estar relacionada a manutenção de um padrão migratório e invasivo da célula que também pode estar ligado a atividade das Rho GTPases, uma vez que observamos formação de adesões focais e filopódios nos KDs das células A172 (**Figura 66**).

Assim como na migração, o ensaio de invasão por *trans-well* permitiu observarmos que KD de SAA1 e SAA1/2 são importantes para a invasão de células A172. KD SAA1 inibiu 77% a invasão, enquanto SAA1/2 inibiu 69% a invasão de células A172 (**Figuras 67 e 68**). KD de SAA4 parece não estar envolvido no processo invasivo destas células, uma vez que não afetou a invasão. A adição de 20 µg/mL de rSAA inibiu a invasão de células controle, bem como inibiu a invasão das células KDs para SAA1 e SAA1/2. Portanto, estes resultados nos permitem sugerir que SAA1 e SAA1/2 são importantes para a migração e invasão de células A172, enquanto SAA4 parece ser um gene funcionalmente associado à manutenção da migração e morfologia celular.

O fato dos KDs terem respondido a rSAA, ao contrário da resposta observado no processo de migração, nos permite considerar que o ensaio de invasão por conter matrigel e o mesmo ser constituído com fatores de crescimento e proteínas de membrana, bem como de MMP-2 e -9 permite a interação da rSAA em um ambiente tumoral mais complexo. Neste caso, SAA poderia estar induzindo uma maior inibição na invasão dos KDs por agir inibindo a atividade de MMP-2 e -9, conforme mostramos neste estudo com células wt.

Nós hipotetizamos também que em A172, SAA produzida pelo tumor seja essencial para a manutenção do mesmo, principalmente os genes SAA1 e SAA2, uma vez que encontramos dificuldade para silenciarmos os mesmos nestas células, pois três de cinco plasmídeos testados induziram a morte das mesmas, enquanto os demais em sua maioria promoveram inibição do crescimento.

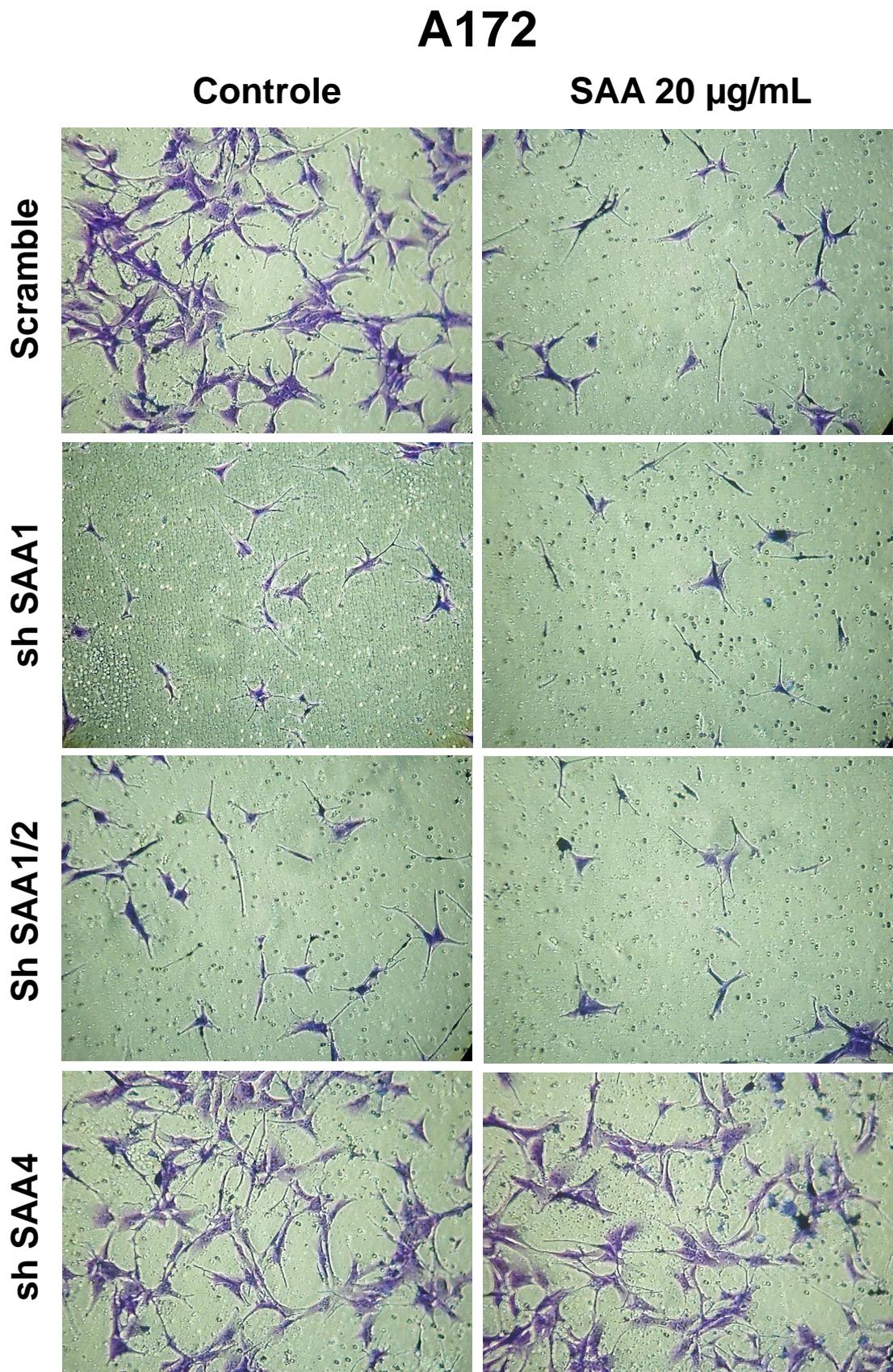


Figura 67: Imagem mostra que Knockdowns de SAA1 e SAA1/2 diminuiu a invasão de células A172. Quando rSAA foi adicionada aos KDs houve um decréscimo na invasão destas células e o perfil de resposta foi similar ao controle quando rSAA foi adicionada.

6×10^4 células/well foram adicionadas à câmara de Boyden com ou sem rSAA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Depois de 48 h, as células que invadiram o matrigel foram fixadas com solução de glutaraldeído e coloridas com azul de toluidina. As fotos são representativas de três experimentos.

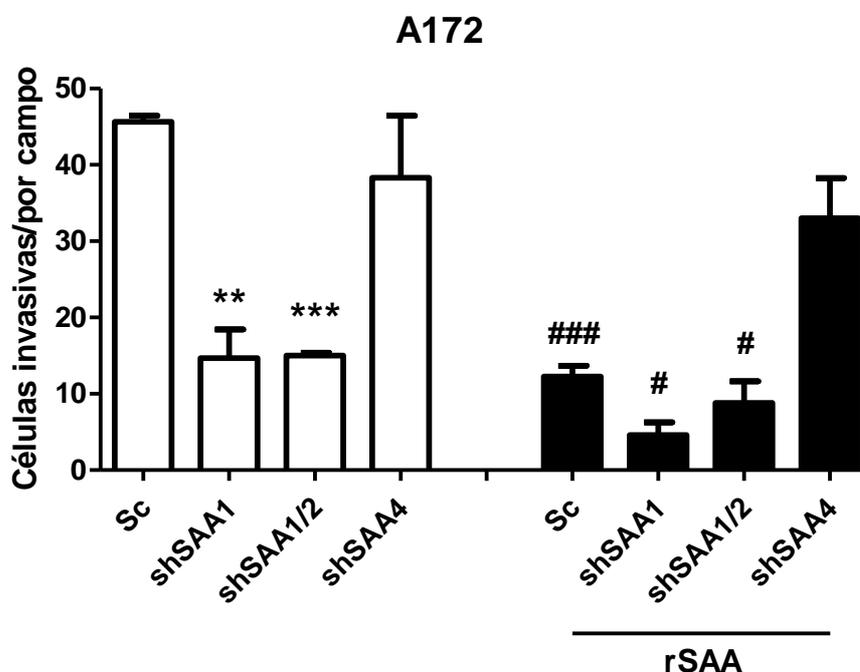


Figura 68: Knockdown de SAA1 e SAA1/2 diminuiu a invasão de células A172. Quando rSAA foi adicionada às células houve um decréscimo na invasão destas células e o perfil de resposta foi similar ao controle. 6×10^4 células/well foram adicionadas à câmara de Boyden com ou sem rSAA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Depois de 48 h, as células que invadiram o matrigel foram fixadas com solução de glutaraldeído, coloridas com azul de toluidina. O gráfico representa a quantificação do número de células que invadiram o matrigel® por campo. Os dados representam a média de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle. # $p < 0,05$; e ### $p < 0,001$ quando comparado aos respectivos KDs não estimulados com rSAA.

6.4 Efeitos dos knockdowns SAA1, SAA1/2 e SAA4 em células T98G

6.4.1 rSAA aumenta a transcrição de SAA1, SAA2 e SAA4 em células controle, enquanto em células knockdowns a transcrição de SAA foi prejudicada

Assim como observado em células A172, rSAA aumentou a transcrição de todos os genes da SAA em células T98G (**Figura 69 A**). O ensaio por RT-PCR permitiu constatar que 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rSAA induziu um aumento de 2,6 vezes de SAA1, 3,6 vezes SAA2 e 2 vezes de SAA4 se comparado às expressões basais observadas na célula (**Figura 69 A**). Assim como para A172, a transcrição dos diferentes genes da SAA produzidos pela T98G, inclusive o gene constitutivo foram

regulados pela rSAA. Este fato pode sugerir que *in vivo* a SAA oriunda de processos inflamatórios pode regular positivamente a transcrição da SAA pela célula tumoral.

O knockdown para os diferentes genes da SAA nas células T98G resultante da técnica de sistema lentiviral usando plasmídeos shRNA permitiu obtermos um KD de SAA1 com 76% de inibição gênica na transcrição de SAA1, entretanto este KD apresentou aumento de aproximadamente 4 vezes na transcrição do gene SAA4, enquanto que o gene SAA2 não foi alterado. O tratamento do KD de SAA1 com rSAA induziu apenas a transcrição do gene SAA4. O KD de SAA1/2 inibiu 78% a transcrição de SAA1, 61% de SAA2 e não afetou a transcrição de SAA4 (**Figura 69 A**). O tratamento do knockdown de SAA1/2 com rSAA induziu apenas a transcrição do gene SAA2, 3,7 vezes. O KD de SAA4 resultou em 65% de inibição da sua própria transcrição, inibiu 40% a transcrição de SAA1 e 52% a transcrição de SAA2 (**Figura 69 A**). O KD SAA4 não responde ao estímulo de 20 µg/mL de rSAA (**Figura 69 A**).

A avaliação das concentrações proteicas de SAA nos KD foi realizada com kit de ELISA e western blot para a proteína SAA4. A análise através do kit de ELISA permitiu constatar que KD para SAA1 inibiu 73% de SAA, enquanto KD para SAA1/2 inibiu 85% a expressão de SAA. O KD para SAA4 inibiu 58% de SAA se comparado ao controle (**Figura 69 B**). É importante considerar que é sabido que o kit de ELISA é eficiente para o doseamento das concentrações de SAA1 e 2, entretanto, não se sabe se SAA4 pode ser quantificada através do mesmo. Em contrapartida, o ensaio de western blot utilizando anticorpo anti-SAA4 específico permitiu verificar que apesar do KD de SAA1 ter mostrado induzir transcrição de SAA4, este aumento não se reflete nas concentrações proteicas (**Figura 69 C**). O KD de SAA1/2 não induziu inibição de SAA4 e o KD de SAA4 induziu inibição de 57% de proteína SAA4 (**Figura 69 C**). É importante ressaltarmos que a indução dos diferentes genes de SAA pela rSAA foi prejudicada nos KDs (**Figura 69 A**), sugerindo que SAA sistêmica tem impacto maior em tecidos que expressam de forma elevada a SAA4.

Apesar de apresentarmos algumas variações nas concentrações de mRNA para SAA4, as mesmas não corresponderam à concentração proteica (**Figura 69 C**). A análise proteica permitiu constatar que obtivemos um KD para SAA1, com 73% de inibição e um KD para SAA1/2 com 85% de inibição, ambos apresentam SAA4 preservada e o KD para SAA4 apresentou 60% de inibição de SAA4 e 58% de inibição de SAA1 e 2.

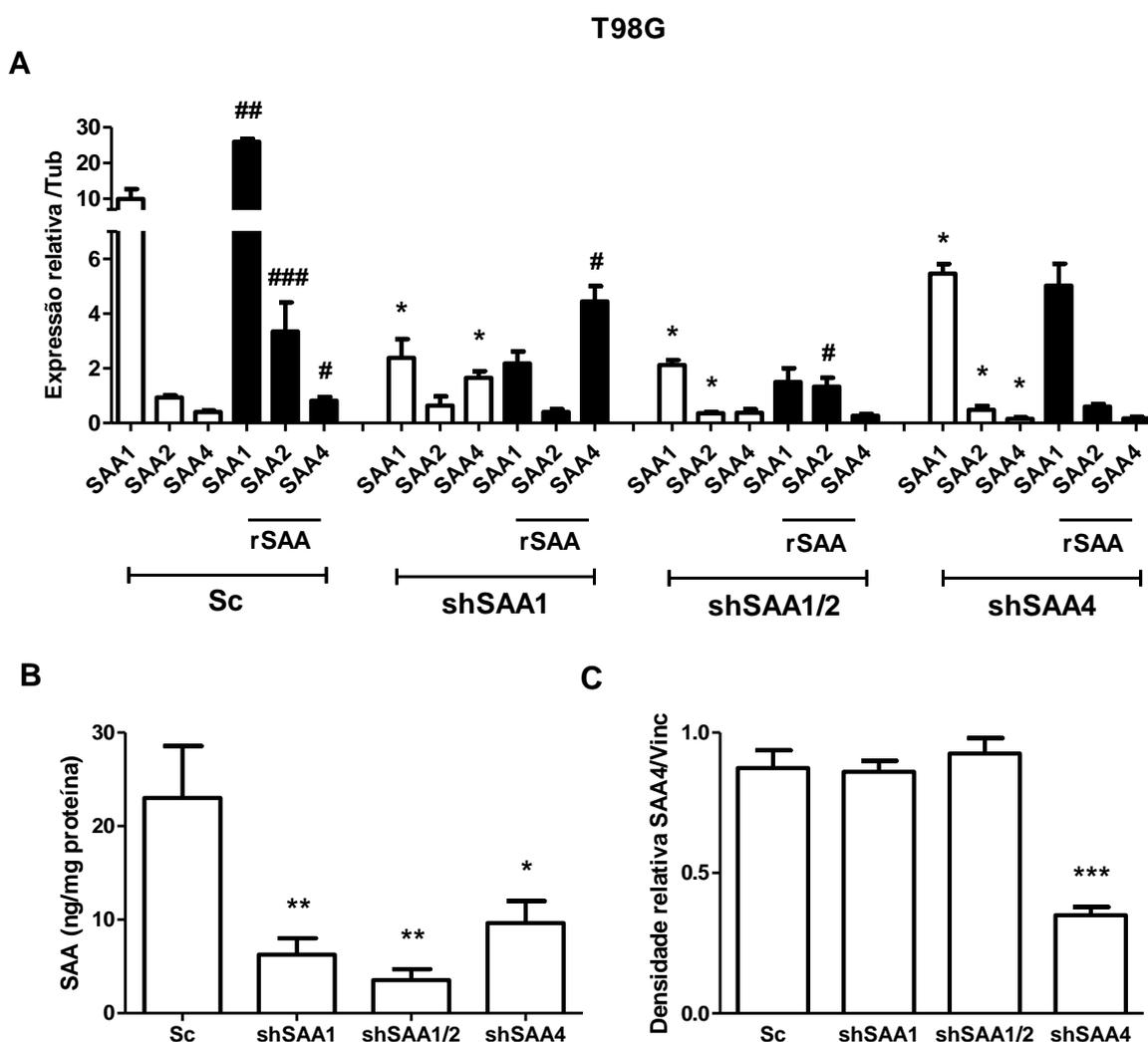


Figura 69: rSAA induz aumento da transcrição de todos genes da SAA em células T98G. RT-PCR (A) foi realizado para investigação da indução por rSAA da transcrição dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 em células controle e KDs. Knockdowns de SAA respondem parcialmente a indução de rSAA (A). Kit de ELISA (B) e western blot (C) foram utilizados para avaliação da especificidade dos KDs em relação aos demais genes da SAA. Dados representam três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado aos respectivos KDs não estimulados com rSAA.

6.4.2 Knockdown de SAA1 e SAA1/2 inibem a proliferação de células T98G

Nós havíamos mostrado previamente que rSAA é um fator de crescimento para células T98G (Knebel et al., 2013). Neste estudo nós confirmamos este efeito através da realização dos KDs. Células T98G KD para SAA1 e SAA1/2 apresentaram inibição da proliferação, enquanto KD para SAA4 não afetou este processo. Quando 5 $\mu\text{g/mL}$ de rSAA foi adicionada às células, apenas KD para SAA1 respondeu aumentando a proliferação, enquanto a adição de 20 $\mu\text{g/mL}$ de

rSAA reverteu o perfil proliferativo tanto do KD para SAA1 quanto para SAA1/2 (**Figura 70**), reforçando a importância da SAA produzida endogenamente pelo tumor e da SAA oriunda de outros processos inflamatórios para a biologia do tumor. Portanto, tanto rSAA quanto SAA endógena são fatores de crescimento para células T98G.

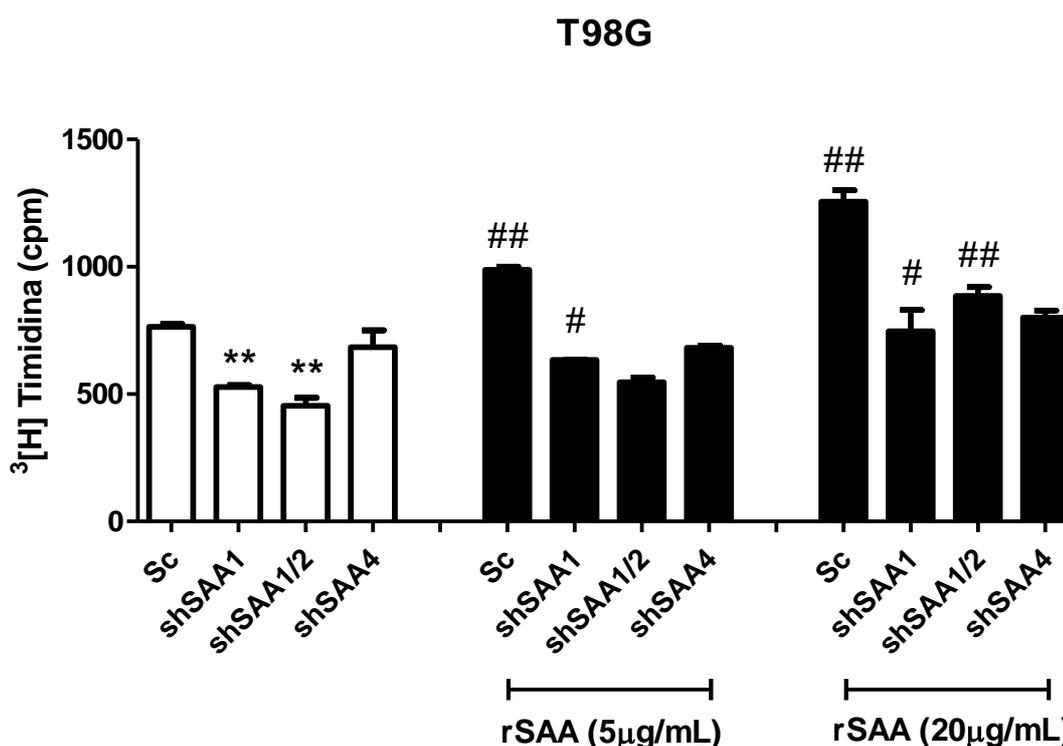


Figura 70: Knockdowns dos genes SAA1 e SAA1/2 inibiu proliferação das células T98G. Quando 20 µg/mL de rSAA foi adicionada às células KD para SAA1 e SAA1/2 houve restabelecimento de seu comportamento proliferativo. Entretanto, as células KD para SAA4 não afetaram a proliferação das células T98G. $1,0 \times 10^4$ cells/mL foram cultivadas e quando alcançaram 70% de confluência foram sincronizadas por 48h em DMEM 0,5% FBS e estimuladas ou não com 5 e 20 µg/mL de SAA por 48 h. [³H] timidina foi adicionada às células 18 h antes de completar 48 h de tratamento com SAA. Proliferação celular foi mensurada usando um contador de cintilação. Dados representam a média de três experimentos. ** $p < 0,01$ versus scramble; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ versus KD não estimulado com rSAA.

6.4.3 Células T98G KDs para SAA1, SAA1/2 e SAA4 migram e invadem menos

Nós já havíamos mostrado que rSAA aumenta migração e invasão de células T98G (Knebel et al., 2013). Neste estudo nós realizamos ensaio de migração por *scratch test* e marcação do citoesqueleto celular com faloidina e, de invasão por *trans well* com células KDs para os diferentes genes da SAA e fortalecemos a hipótese de que SAA desempenha função pró-tumoral em células T98G. KDs para

SAA1 e SAA1/2 induziram inibição de migração de aproximadamente 30% das células T98G, enquanto KD de SAA4 inibiu aproximadamente 47% a migração destas células. A adição de 20 µg/mL de rSAA aumentou a migração das células KD SAA1 e SAA1/2 (**Figuras 71 e 72**). KD para SAA4 não consegue responder ao estímulo de rSAA, sugerindo que SAA4 é essencial para a migração destas células.

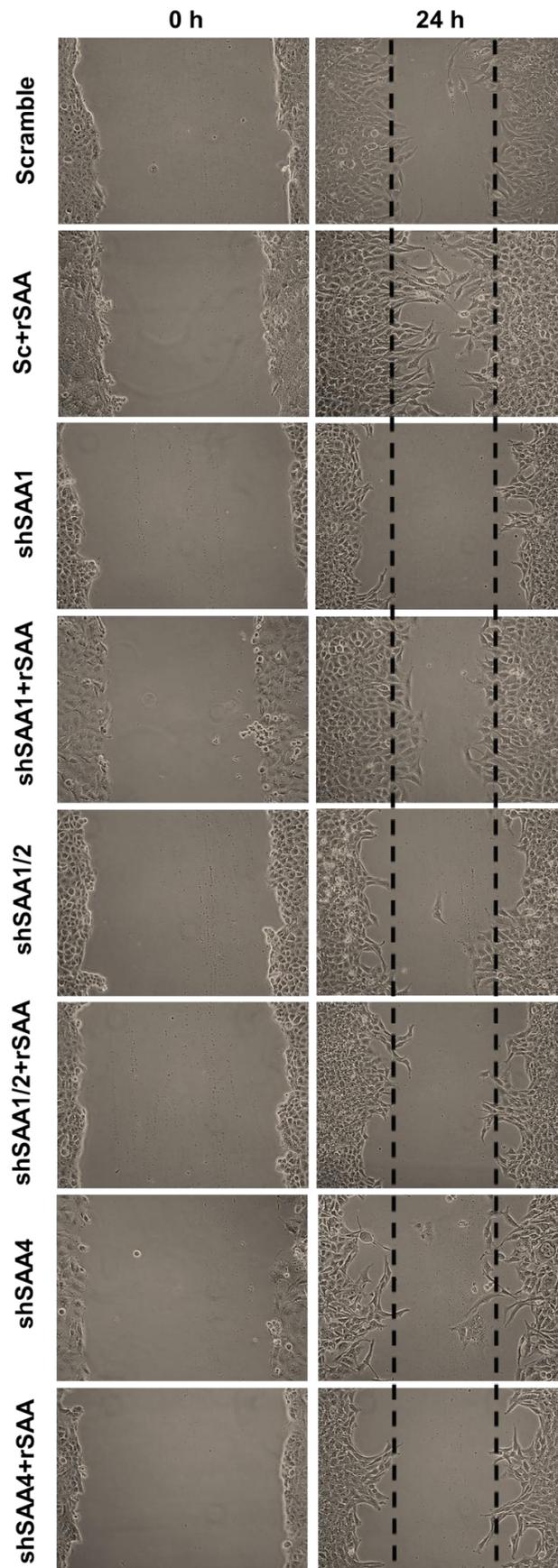


Figura 71: Imagem mostra que knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 afetaram a migração das células T98G. Scratch test foi realizado para análise do comportamento migratório dos

diferentes KDs de SAA comparado aos controles estimulados ou não com rSAA por 24h. Quando 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rSAA foi adicionada tanto KD SAA1 quanto SAA1/2 aumentaram a migração. KD SAA4 não responde ao estímulo da rSAA. As fotos foram adquiridas no tempo zero e 24 h no microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico. Fotos são representativas de três experimentos independentes.

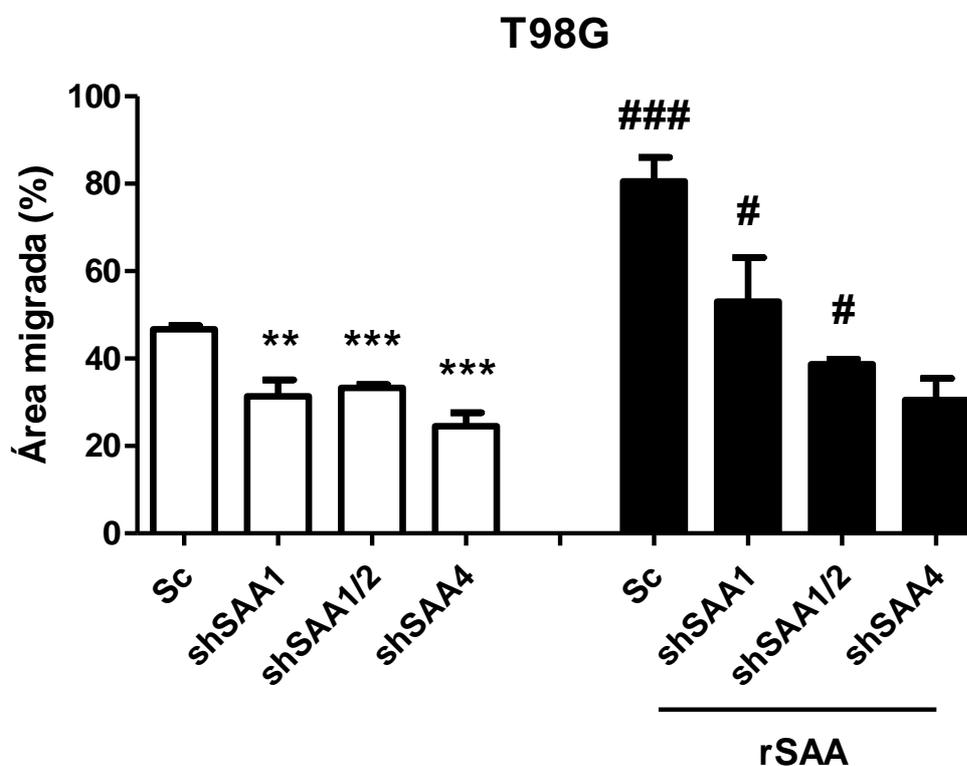


Figura 72: KDs de SAA1, SAA1/2 e SAA4 inibem a migração de células T98G. Scratch test foi realizado para determinação do percentual de área migrada pelos KDs de SAA comparado ao controle estimulados ou não com rSAA por 24h. Quando 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rSAA foi adicionada tanto KD SAA1 quanto SAA1/2 aumentaram a migração. Quantificação da área migrada foi analisada no software Axio Vision. Dados representam a média de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus controle. # $p < 0,05$; e ### $p < 0,001$ quando comparado aos respectivos KDs não estimulados com rSAA.

Realizamos microscopia imunofluorescente para avaliar o impacto da SAA no fenótipo migratório e na organização do citoesqueleto de actina. Entretanto, a alta confluência das células não nos permite fazer esta análise. Portanto, consideramos que seria possível fazer uma avaliação comparativa entre KDs e controles a respeito das mudanças observadas no perfil proliferativo de células controles e KDs. Conforme podemos observar (**Figura 73**) células controle crescem em colônias e proliferam mais rapidamente que células KDs para SAA. Podemos sugerir que KD de SAA1 não parece afetar a organização em colônia destas células, enquanto KDs de SAA1/2 e SAA4 parecem induzir crescimento lento das células e prejuízo na formação das colônias (**Figura 73**). Quando adicionamos rSAA ao controle há um

aumento do número de células migrando, enquanto nos KDs pode ser observado uma recuperação da organização em colônias destas células (**Figura 73**).

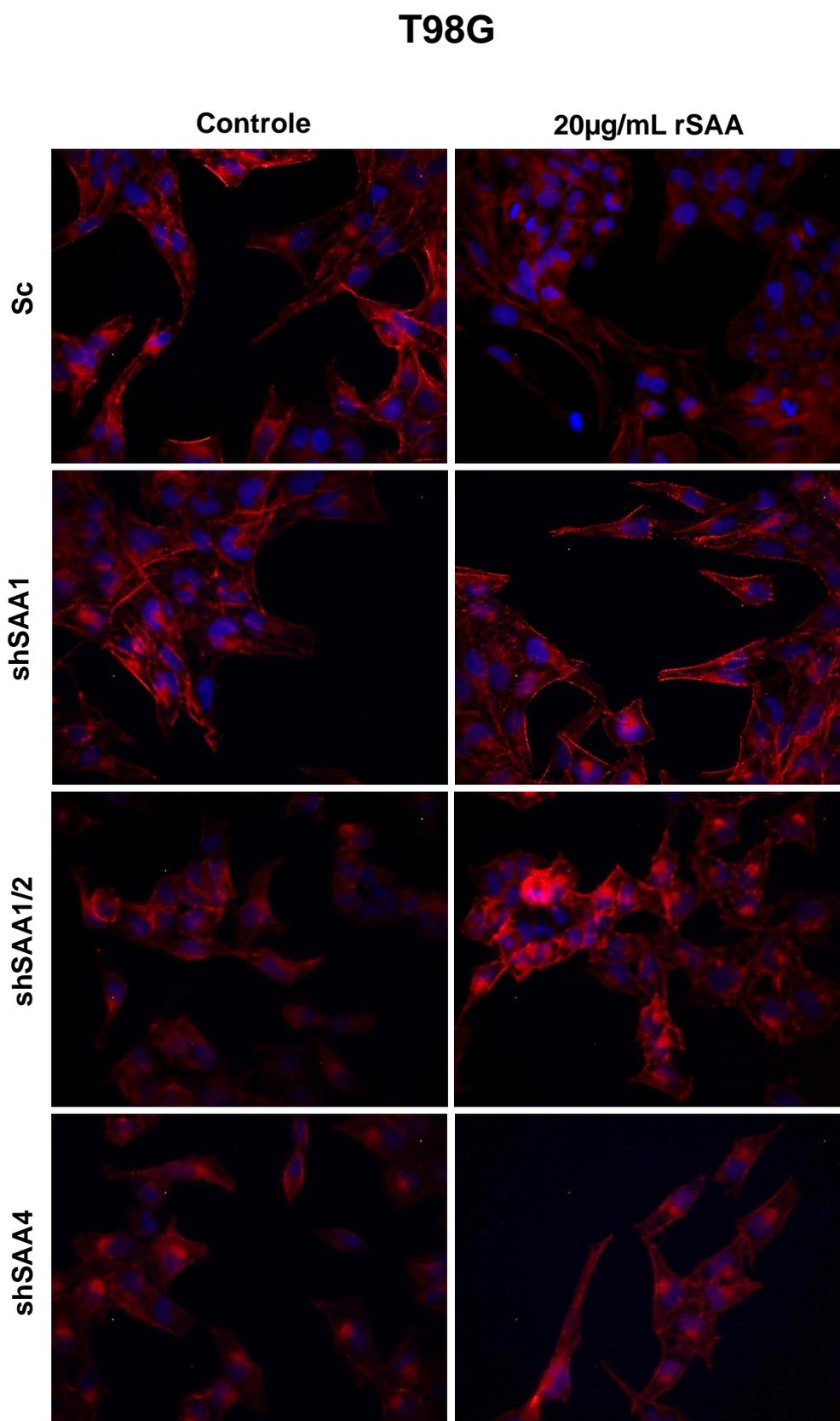


Figura 73: *KD de SAA1/2 e KD de SAA4 parecem induzir reorganização do citoesqueleto de*

actina e fenótipo migratório de células T98G. Células controle e KDs para SAA foram tratadas por 24h com 20 µg/mL de rSAA, em seguida fixadas, permeabilizadas e marcadas com faloidina para visualização da organização dos filamentos de actina. Fotos foram adquiridas utilizando o software Nis Elements e microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse 80i, com lente de aumento 400x. Fotos representam um único experimento.

O mesmo perfil inibitório observado para KDs de SAA na migração (**Figuras 71 e 72**) foi encontrado para a invasão de células T98G. Este efeito pode ser observado pela diminuição no número de células capazes de invadir o matrigel em 48h quando comparado ao controle (**Figura 74**). KD de SAA1 induziu inibição de aproximadamente 40% na invasão destas células, enquanto KD de SAA1/2 inibiu 50% e KD de SAA4 inibiu 33% a invasão (**Figuras 74 e 75**). Quando 20 µg/mL de rSAA foi adicionada às células KD de SAA1 e SAA1/2 houve reversão deste processo e aumento de aproximadamente 2,5 vezes na invasão destas células, enquanto KD de SAA4 não responde à rSAA (**Figuras 74 e 75**).

O fato do KD de SAA4 ter induzido prejuízo na migração e invasão, mas não ter respondido ao tratamento com rSAA nos sugere que o gene SAA4 seja essencial para a regulação da migração e isto poderia justificar o fato do mesmo ser constitutivo e estar presente em todas as células humanas. Conforme já discutimos anteriormente rSAA parece ser capaz de exercer efeitos sobre a migração (**Figuras 71 e 72**) e invasão (**Figuras 74 e 75**) de células controle e KDs SAA1 e SAA1/2 possivelmente porque as mesmas apresentam expressão de SAA4 preservada.

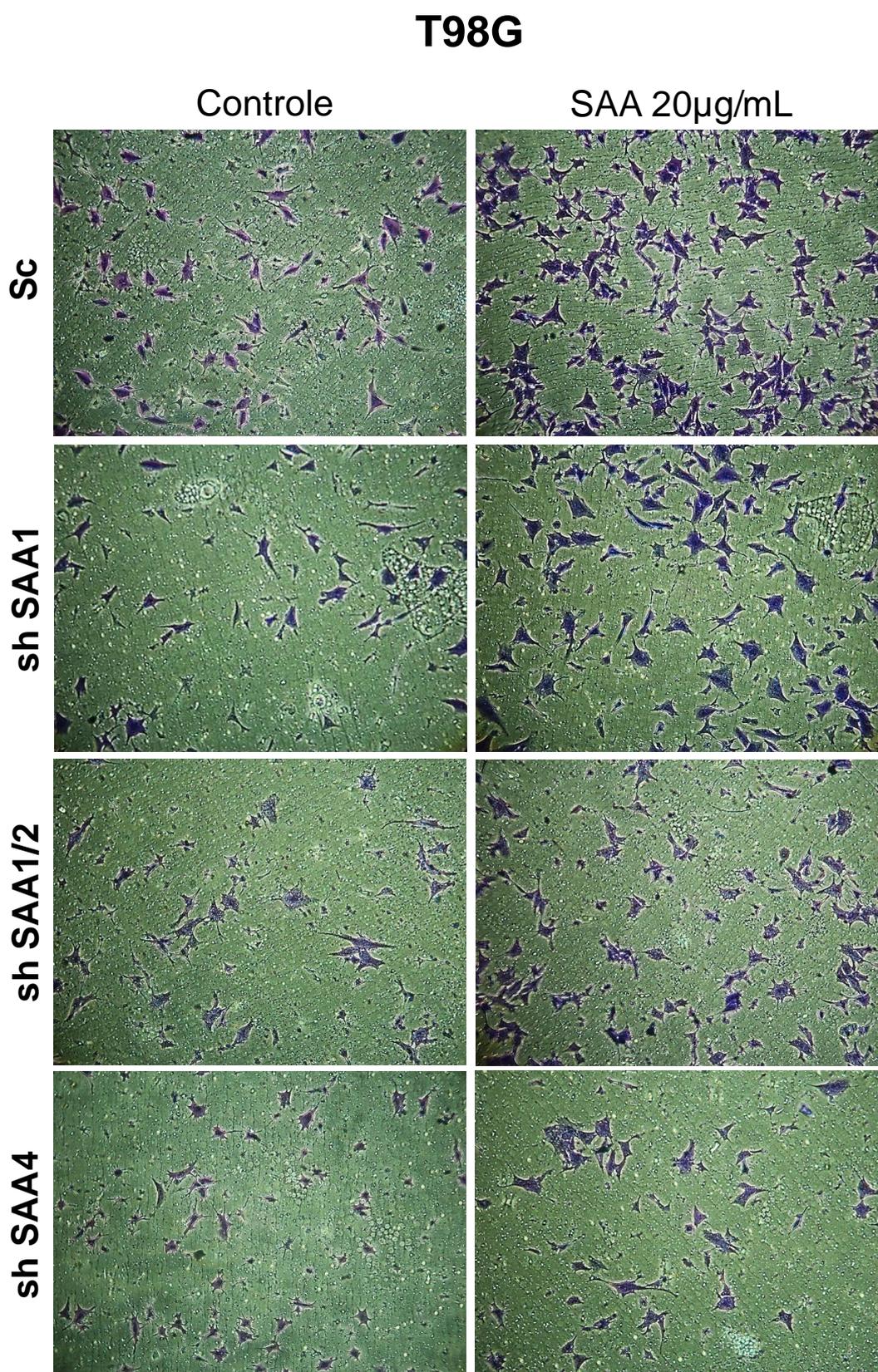


Figura 74: Imagem mostra que knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 diminuíram a invasão de células T98G. Quando rSAA foi adicionada a estas células houve recuperação do comportamento invasivo, com exceção de SAA4. 6×10^4 células/well foram adicionadas à câmara de boyden com ou sem rSAA (20 μ g/mL). Depois de 48 h, as células que invadiram o matrigel foram fixadas com solução de glutaraldeído, coloridas com azul de toluidina e

analisadas em microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico. As fotos representam a média de três experimentos independentes.

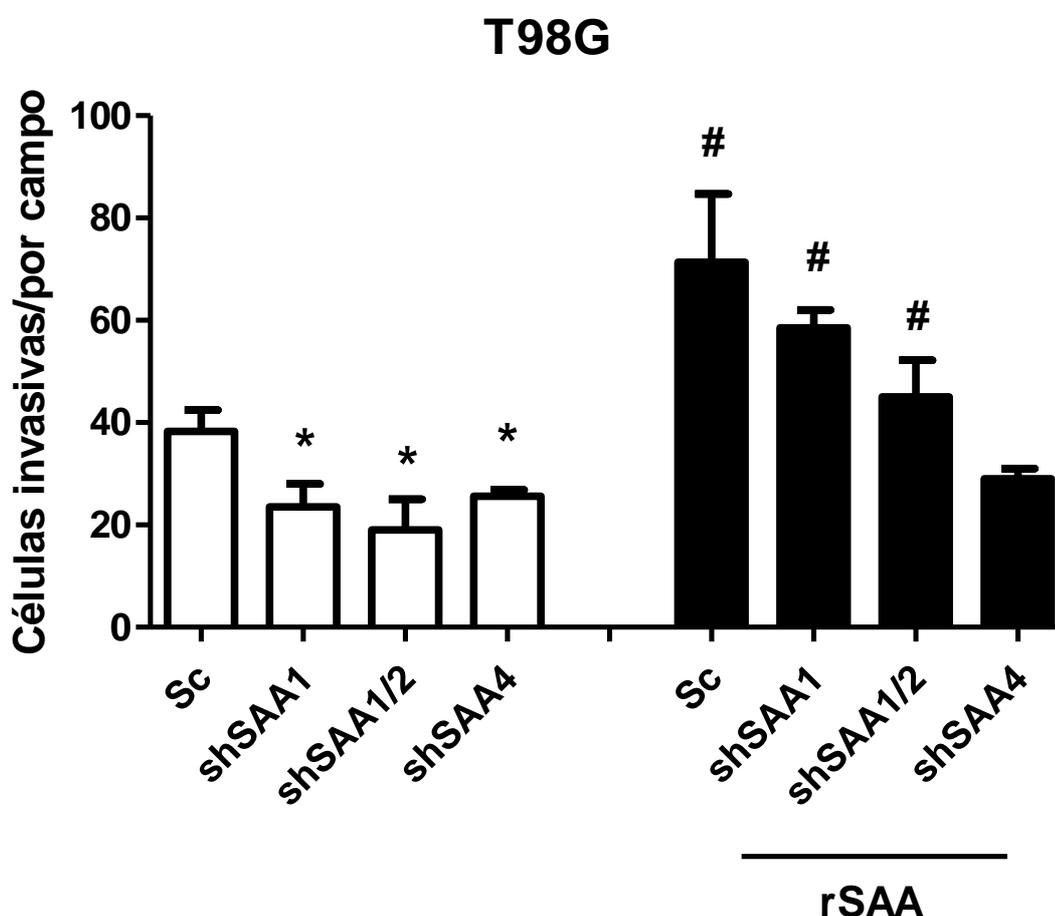


Figura 75: Knockdowns de SAA1, SAA1/2 e SAA4 diminuíram a invasão de células T98G. Quantificação do número total de células que invadiram o matrigel® na ausência e presença de 20 µg/mL de rSAA. Fotos foram adquiridas em microscópio óptico invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x e 2.4 de zoom óptico e 10 campos foram contados. Os dados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ versus controle. # $p < 0,05$ versus os respectivos KDs não estimulados com rSAA.

6.4.4 Knockdowns de SAA alteram a expressão de RAGE

Conforme mostramos neste estudo, RAGE é expresso em células T98G (Figuras 21 e 22) e de acordo com os resultados obtidos utilizando anticorpo neutralizante anti-RAGE este receptor mostrou ser importante para a viabilização dos processos de proliferação, migração e invasão pela rSAA. Por este motivo realizamos RT-PCR e western blot de células controle e KDs a fim de compreendermos melhor este envolvimento. A análise por qRT-PCR (Figura 76) e western blot (Figura 77) permitiram observar que KDs para SAA induziram

diminuição da transcrição de mRNA do receptor RAGE, sendo que as transcrições dos mesmos aumentaram quando as células foram tratadas com 20 µg/mL de rSAA por 24h (**Figura 74**), enquanto o western blot mostrou apenas aumento da expressão de RAGE pelo KD SAA4 (**Figura 77**), entretanto este tratamento foi de apenas 12h. Estes resultados corroboram com a inibição observada na proliferação, migração e invasão de células T98G induzidas por rSAA quando utilizamos nestes ensaios um anticorpo anti-RAGE, sugerindo a existência de um eixo SAA-RAGE na progressão desta linhagem celular.

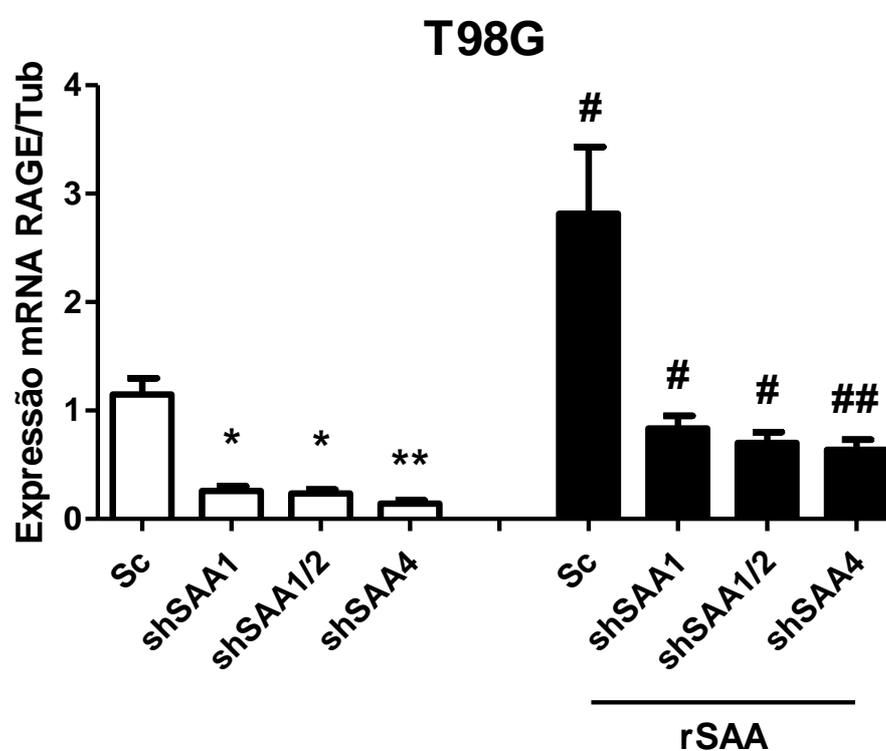


Figura 76: Knockdowns de SAA inibem transcrição de mRNA de RAGE. RT-PCR foi realizado para quantificação da inibição da transcrição provocada pelos KDs. Quando os KDs foram estimulados com 20 µg/mL de rSAA foi observado aumento da transcrição de RAGE. Dados representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle. # $p < 0,05$; e ## $p < 0,01$ quando comparado aos respectivos KDs não estimulados com rSAA.

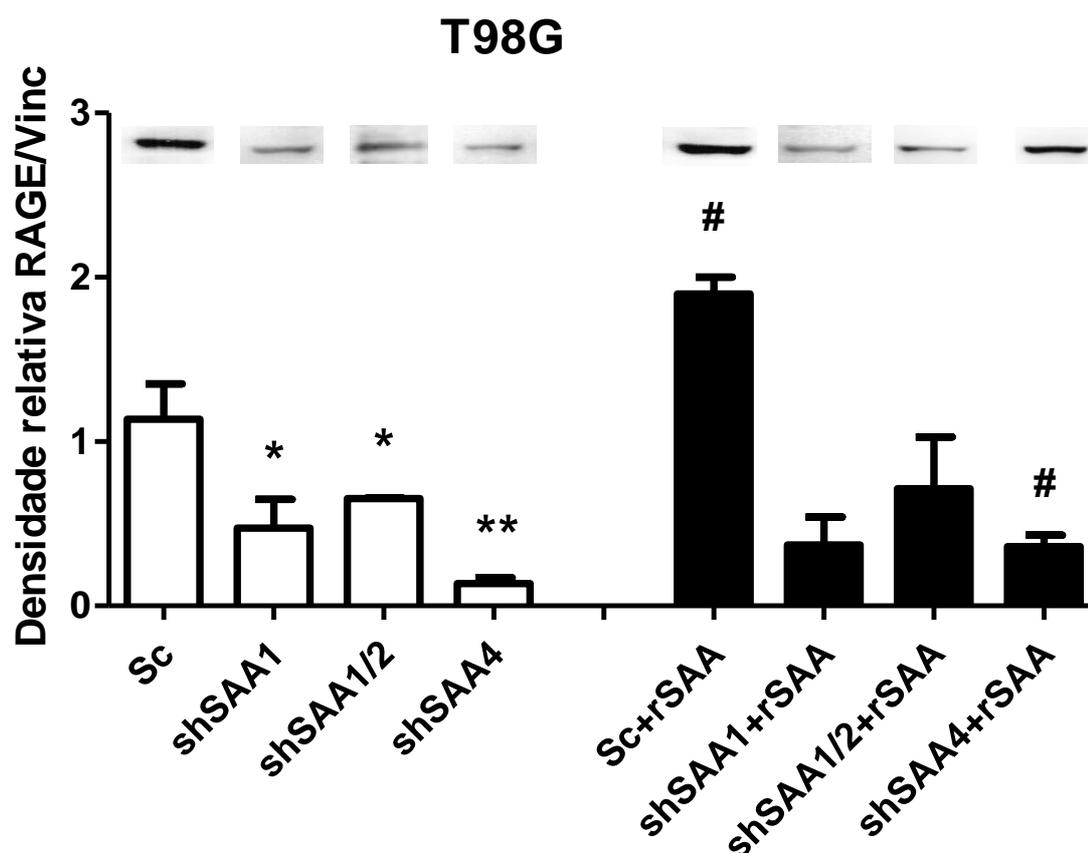


Figura 77: Knockdowns de SAA inibiram a expressão de RAGE. Western blot foi realizado e software Image J foi usado para quantificação das bandas de RAGE relativo ao endógeno vinculina para KDs de SAA e controle. Dados representam a média de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle. # $p < 0,05$; e ## $p < 0,01$ quando comparado aos respectivos KDs não estimulados com rSAA.

RAGE tem sido reconhecido como uma molécula chave no desenvolvimento de diversas patologias crônicas, incluindo câncer (Taguchi et al., 2000). São crescentes os estudos que apontam RAGE como fator fundamental para o desenvolvimento e progressão de muitos tipos de tumores. RAGE é capaz de interagir e se ligar com diversos ligantes pró-inflamatórios, dentre eles a SAA (Cai et al., 2007; Okamoto et al., 2008). Algumas das funções desenvolvidas pela SAA são similares às observadas para a proteína HMGB1, a qual sinaliza através de RAGE processos como: quimiotaxia, proliferação, migração (Kang et al., 2013). Menos expressão de RAGE previne tumorigênese e inibe produção de ATP (Kang et al., 2013). Na clínica, expressão de RAGE é associada com atividade invasiva e metastática (Sasahira et al., 2005). Em animais, a inibição da interação HMGB1-RAGE inibe crescimento e metástase (Taguchi et al., 2000).

6.5 SAA em tecidos normais de cérebro e em Glioblastomas

Inúmeros estudos clínicos apontam uma correlação direta entre concentrações séricas elevadas de SAA e progressão de tumores e correlação inversa entre concentrações séricas de SAA e sobrevivência do paciente (Malle, Sodin-Semrl & Kovacevic, 2009). Estas correlações sugerem SAA como um potencial biomarcador para monitorar a progressão do câncer (Khan et al., 2004; Cho et al., 2004; Moshkovski et al., 2005; Pierce et al., 2009). Entretanto, não existem estudos clínicos mostrando estas correlações em pacientes com GBM. Por este motivo, através de uma parceria com a Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie da FMUSP analisamos a transcrição de mRNA dos diferentes genes da SAA e a expressão de SAA em amostras de cDNA e em tecido cerebral não neoplásico e tumoral, bem como analisamos concentrações séricas de SAA em pacientes com diferentes graus de gliomas.

6.5.1 Transcrição de mRNA de SAA1 está aumentada em pacientes com GBM

A análise da transcrição de mRNA dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 no tecido cerebral de pacientes sem neoplasia e diagnosticados com gliomas de diferentes graus mostrou que somente pacientes portadores de GBM apresentaram transcrição aumentada do gene SAA1 se comparado aos pacientes com estadios I, II e III e ao controle (**Figura 78**). A análise do gene SAA2 sugere que o mesmo não é expresso em gliomas de grau I, II e III e muito pouco expresso em cérebro de pacientes com GBM (**Figura 79**). Não foi constatada expressão de SAA4 tanto em cérebro não neoplásico quanto em tecido em diferentes estadios dos gliomas (**Figura 80**). Além disso, o progresso da doença não implica em aumento da transcrição destes genes (**Figuras 78 e 79**).

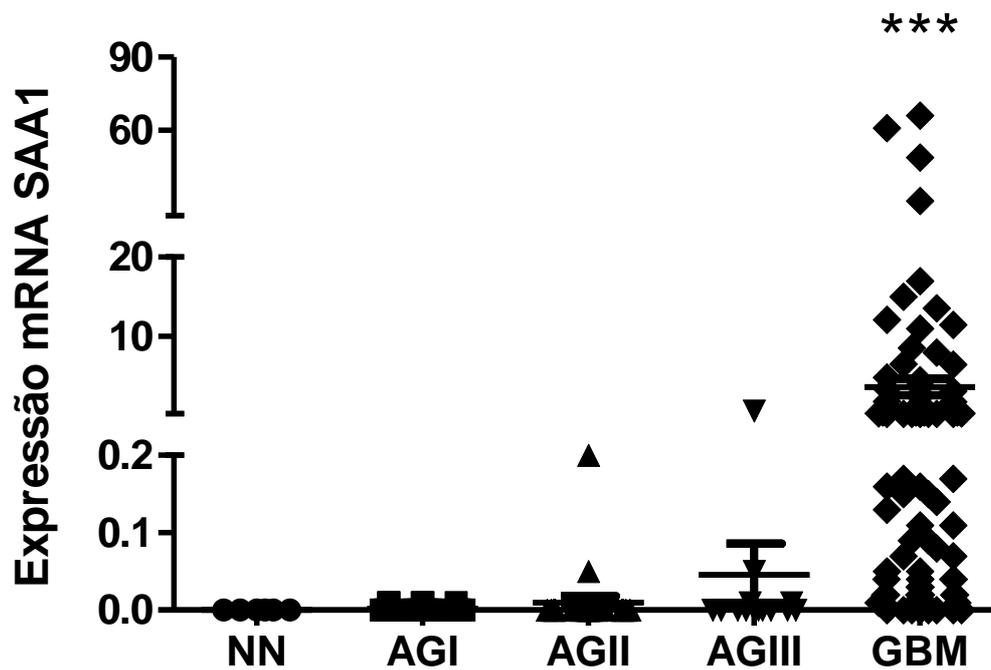


Figura 78: Tecido cerebral de *pacientes com GBM* apresentaram transcrição de mRNA de SAA1 elevada comparado a tecido cerebral não neoplásico e de *pacientes diagnosticados com grau I, II e III de gliomas*. A quantificação foi realizada por qRT-PCR. Dados compreendem o cDNA proveniente do tecido de cérebro normal de seis pacientes, cérebro de 25 pacientes diagnosticados com astrocitoma grau I (AGI) e astrocitoma grau II (AGII), cérebro de 14 pacientes portadores de grau III (AGIII) e cérebro de 103 pacientes diagnosticados com Glioblastoma (GBM). *** $p < 0,001$.

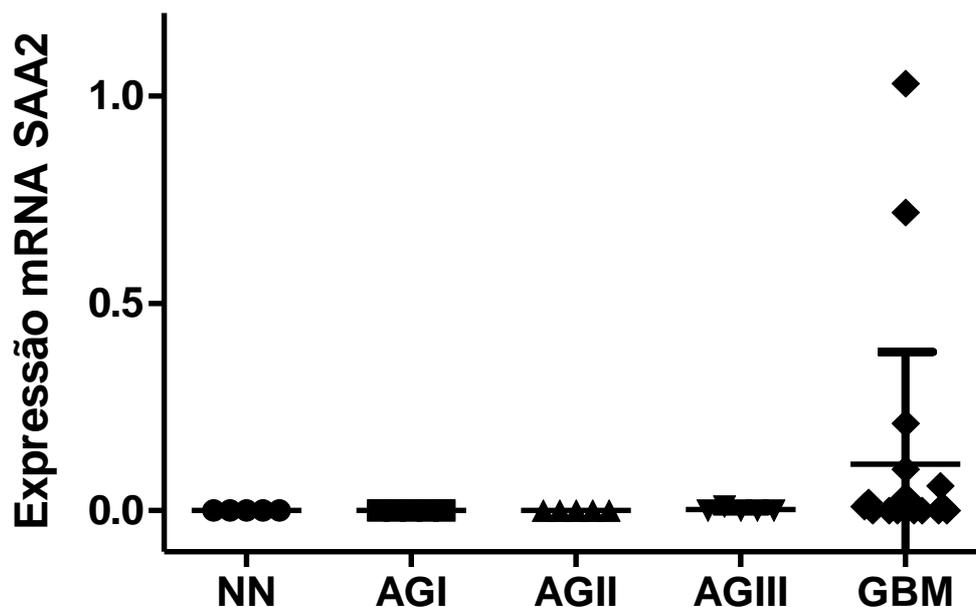


Figura 79: Transcrição de mRNA de SAA2 não foi detectada em tecido cerebral de *pacientes sem neoplasia ou portadores de AGI, AGII e AGIII*. *Pacientes diagnosticados com GBM* apresentaram pouca transcrição de mRNA de SAA2. qRT-PCR foi utilizado para

quantificação da transcrição. Dados compreendem o cDNA proveniente do tecido de cérebro não neoplásico de cinco pacientes, e do cérebro de cinco pacientes com AGI, AGII e AGIII e, cérebro de 20 pacientes diagnosticados com GBM.

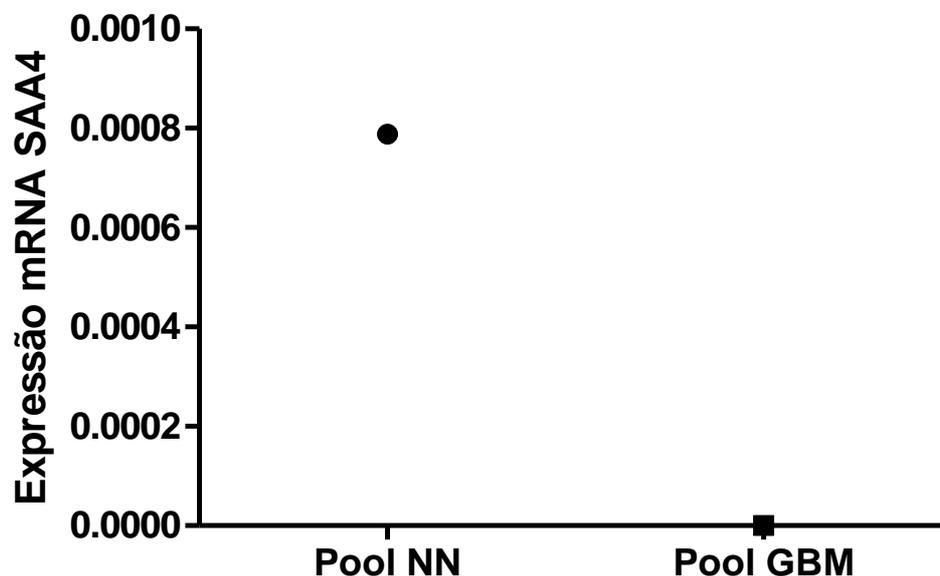


Figura 80: Transcrição de mRNA do gene SAA4 não foi detectado no cérebro de pacientes sem neoplasia ou diagnosticados com GBM. Um pool de 20 amostras foi usado para avaliar a existência ou não de expressão de SAA4 no tecido cerebral de pacientes saudáveis ou com GBM. qRT-PCR foi utilizado para quantificação da transcrição.

6.5.2 Expressão de SAA está aumentada no tecido de pacientes com GBM

A análise imunohistoquímica de SAA em tecidos de cérebro sem neoplasia e em tecidos de cérebro de pacientes diagnosticados com diferentes graus de glioma mostrou que SAA é um produto de células de GBM, uma vez que somente pacientes portadores de GBM apresentaram aumento significativo de expressão de SAA no citoplasma de células tumorais quando comparado a cérebro de pacientes sem neoplasia e com AGI, AGII e AGIII (**Figura 81 e 82**). O score da expressão de SAA1 foi positivamente correlacionada com grau e severidade do tumor (**Figura 83**), assim como observado no estudo realizado com Pentraxina 3 (PTX3), um componente essencial da resposta imune inata com funções similares a PCR e SAA (Locatelli et al., 2013). Não foram constatadas diferenças significativas entre gliomas de grau I, II e III. A análise semiquantitativa pode ser visualizada na Figura 83.

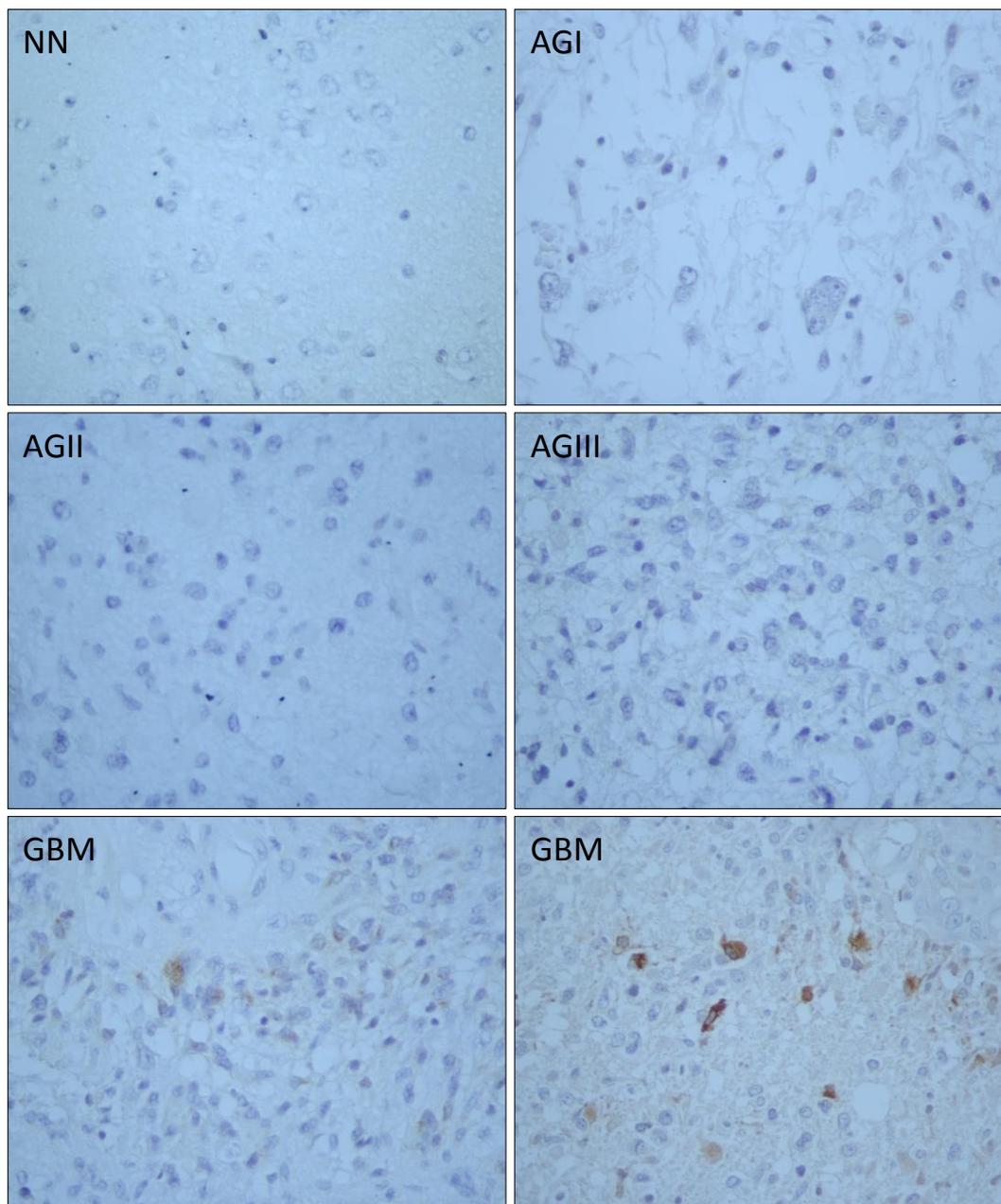


Figura 81: Tecidos cerebrais de pacientes diagnosticados com GBM apresentaram elevada expressão de SAA se comparado ao controle (NN) e ao tecido cerebral de pacientes com AGI, AGII e AGIII. Expressão de SAA foi examinada por imunohistoquímica. As imagens são representativas de um (1) tecido de cérebro sem neoplasia, duas amostras de tecidos de pacientes com AGI, AGII, AGIII e oito amostras de tecido cerebral de pacientes com GBM. As fotos foram adquiridas em microscópio invertido Nikon TS100 com lente de aumento 400x.

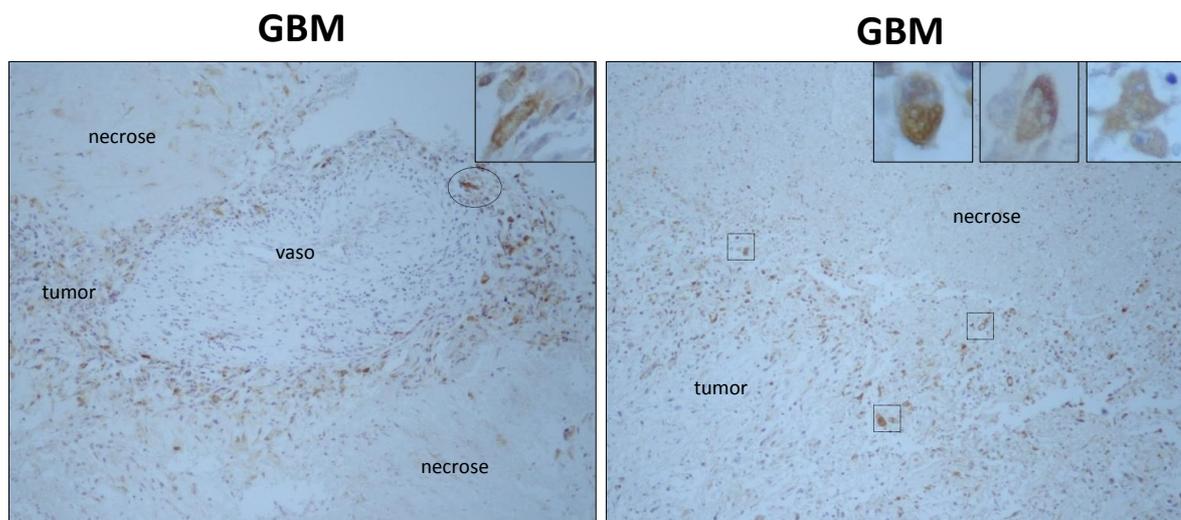


Figura 82: Tecidos cerebrais de *pacientes diagnosticados com GBM* apresentaram elevada expressão de SAA se comparado ao cérebro sem neoplasia e ao tecido de cérebro de *pacientes com AGI, AGII e AGIII*. Células tumorais em destaque no inserto da figura foram aumentadas 600x e permitem uma melhor visualização da marcação de SAA no citoplasma de células tumorais. Expressão de SAA foi examinada por imunohistoquímica. As imagens são representativas de oito amostras de tecido cerebral de *pacientes com GBM*. As fotos foram adquiridas em microscópio invertido Nikon TS100 com lente de aumento 100x.

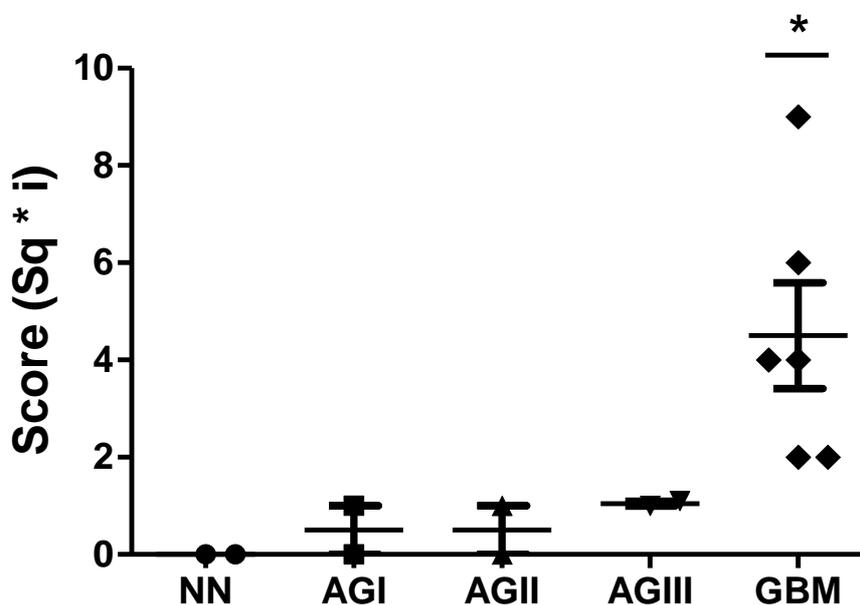


Figura 83: Tecido cerebral de *pacientes com GBM* apresentaram aumento de expressão de SAA se comparado ao tecido de cérebro sem neoplasia e aos estadios mais baixos dos gliomas. Análise semiquantitativa (score) da expressão de SAA em tecido cerebral de *pacientes saudáveis e com diferentes graus de gliomas* foi realizada por dois investigadores, considerando quantidade de células marcadas (Sq) e intensidade de marcação (i) para SAA. Os dados correspondem a análise do tecido de dois *pacientes controles*, 2 *pacientes com AGI*, 2 *pacientes com AGII*, 2 *pacientes com AGIII* e seis *pacientes com GBM*. * $p < 0,05$ versus controle e AGI, AGII e AGIII.

6.5.3 Pacientes diagnosticados com GBM apresentaram aumento sérico de SAA

A análise quantitativa do soro dos pacientes com diferentes graus de glioma indicou que somente pacientes com GBM apresentaram um aumento significativo de SAA se comparado a indivíduos sem neoplasia (**Figura 84**). Não existe diferença na concentração sérica de SAA entre os pacientes quando comparamos os diferentes graus de glioma entre si. Este aumento sérico de SAA em pacientes com GBM também pode ser observado por western blot (**Figura 85**).

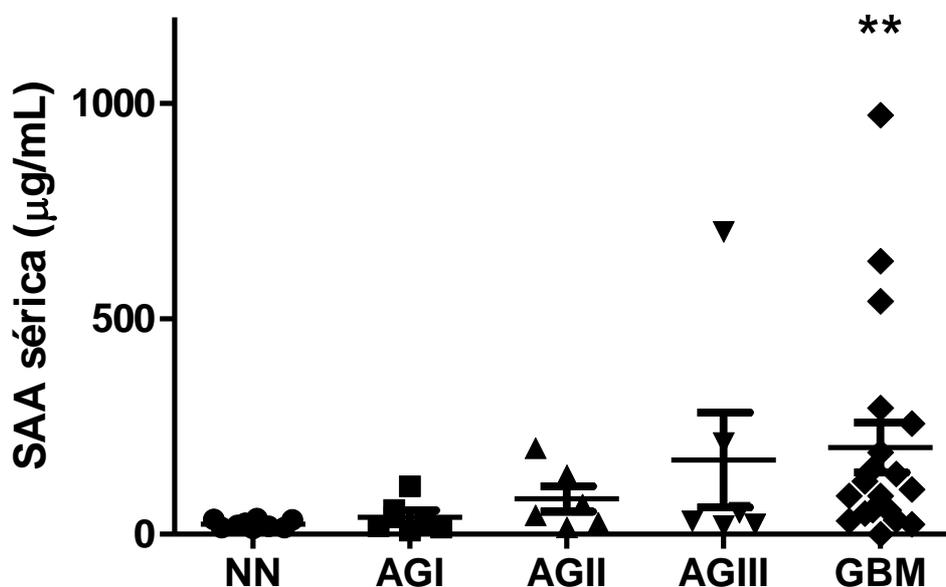


Figura 84: Pacientes com GBM apresentaram concentrações séricas de SAA elevadas se comparado aos pacientes sem neoplasias. Concentrações séricas de SAA foram quantificadas por ELISA. Os dados compreendem o soro de dez pacientes controles, seis pacientes diagnosticados com AGI, AGII, AGIII e 19 diagnosticados com GBM. ****** $p < 0,01$ versus controle.



Figura 85: Western blot representativo do aumento de SAA no soro de pacientes com GBM. O grupo controle (N) e os demais graus de gliomas não apresentaram expressão de SAA.

O aumento sérico de SAA observado em pacientes portadores de GBM provavelmente seja oriundo de uma produção *in situ*, uma vez que somente constatamos aumento de expressão de SAA no tecido tumoral de pacientes com GBM. Ainda, se considerarmos que GBM são tumores altamente invasivos e este é o grau mais avançado dos gliomas (grau VI) o aumento de SAA poderia estar relacionado ao caráter altamente invasivo do mesmo, uma vez que não observamos aumento de SAA nos graus mais baixos dos gliomas se comparado ao controle. Portanto concentrações de SAA sistêmica seriam incrementadas pelo próprio tumor.

Entretanto, não observamos diferença significativa na sobrevida dos pacientes quando analisamos o status de expressão de SAA1 (**Figura 86**) e o status da concentração sérica de SAA (**Figura 87**), conforme se pode observar nas curvas de Kaplan-Meier (**Figuras 86 e 87**), a qual considera indivíduos vivos (zero) e indivíduos mortos (1) e hiper expresso (1) quando for maior ou igual a mediana de expressão e hipo expresso (0) quando menor do que a mediana de expressão. A sobrevida dos pacientes foi monitorada por 60 meses após a primeira ressecção do tumor. Também incluímos um gráfico da concentração sérica de SAA pela sobrevida em meses. Apesar do número de pacientes ser pequena não descartamos a existência de uma correlação inversa entre esses parâmetros (**Figura 88**).

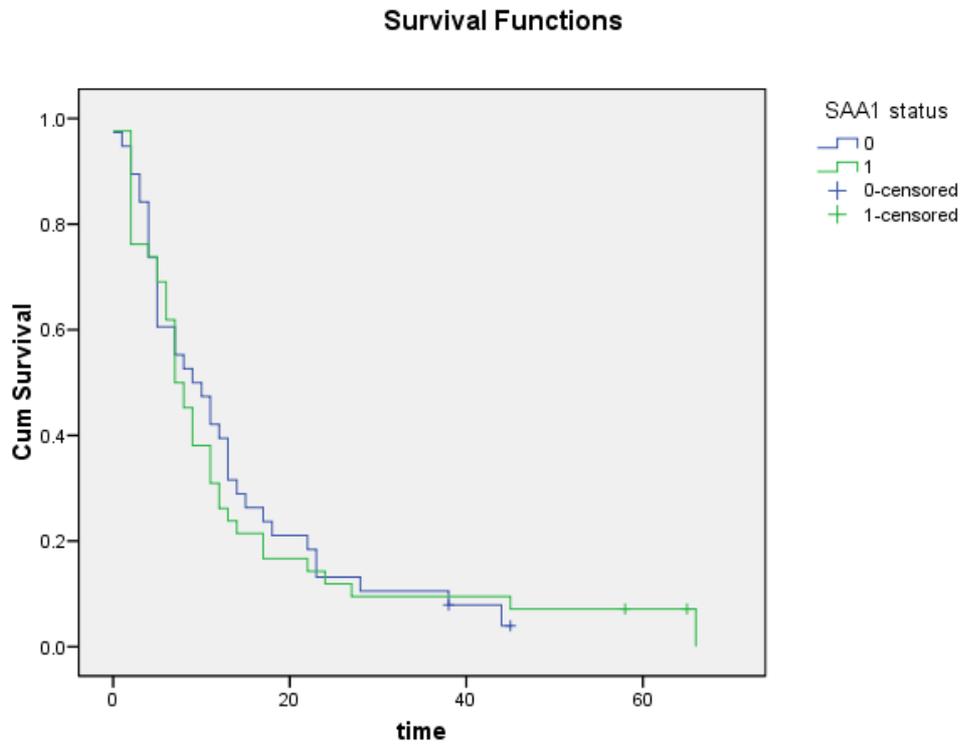


Figura 86: Curva de sobrevivência - Kaplan Meier - dos pacientes com GBM em função da expressão de SAA1. Não existe correlação entre aumento da expressão de SAA1 e sobrevivência dos pacientes com GBM. Dados compreendem a análise de 80 pacientes com GBM. Zero (0) corresponde a indivíduos vivos e um (1) corresponde a indivíduos mortos. A avaliação da sobrevivência dos pacientes foi realizada por 60 meses após a primeira ressecção do tumor.

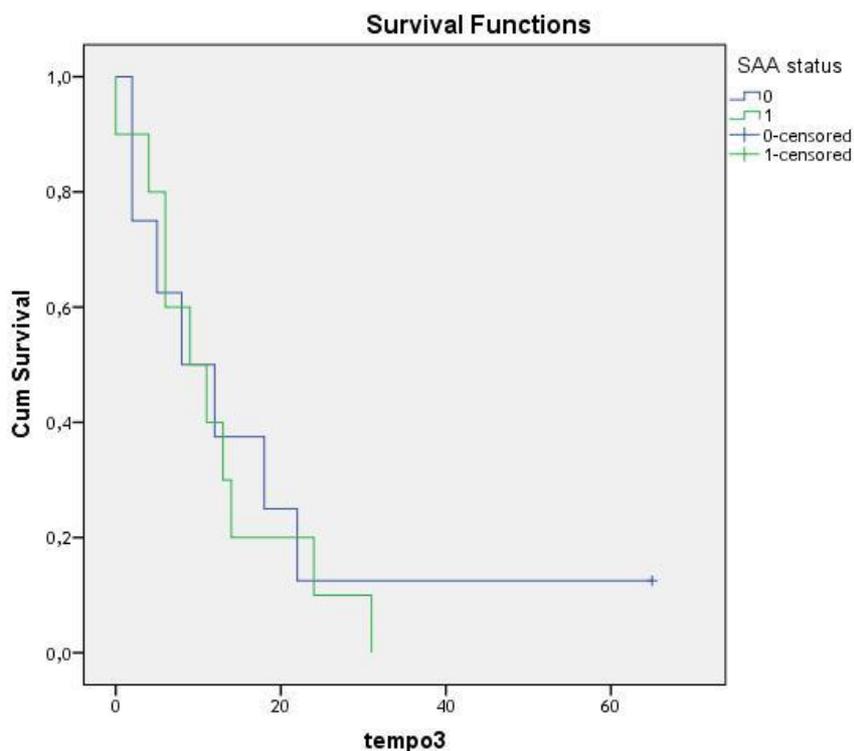


Figura 87: Curva de sobrevida – Kaplan Meier - dos pacientes com GBM em função das concentrações séricas de SAA1. Não existe correlação entre aumento das concentrações séricas de SAA1 e sobrevida dos pacientes com GBM. Dados compreendem a análise de 18 pacientes com GBM. Zero (0) corresponde a indivíduos vivos e um (1) corresponde a indivíduos mortos. A avaliação da sobrevida dos pacientes foi realizada por 60 meses após a primeira ressecção do tumor.

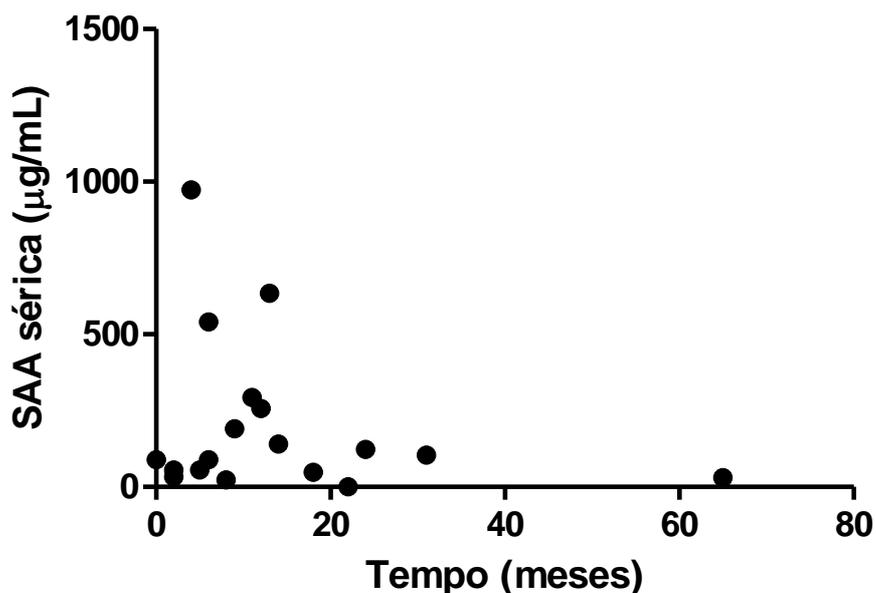


Figura 88: Correlação da concentração sérica da SAA de pacientes com GBM em função do tempo de sobrevida. Dados compreendem a análise de 18 pacientes com GBM.

Além da investigação de expressão de SAA1 no tecido cerebral de pacientes com diferentes graus de gliomas, bem como no soro, também em um trabalho colaborativo com a Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie especulamos a possibilidade de existir correlação na expressão de SAA1 com expressão dos receptores de quimiocinas: CXCR4 e CXCR7, proteína marcadora de macrófagos (CD163) e o fator indutor de hipóxia (HIF-1 α) no tecido de GBM.

A expressão de CXCR4, CXCR7, CD163 e HIF-1 α foram comparadas a expressão de SAA1 para verificar o grau de co-expressão dos mesmos em GBM. As análises de correlação entre SAA1 e CXCR4, CXCR7, CD163 e HIF-1 α mostraram correlação positiva para GBM ($r=0,423$; $r=0,329$; $r=0,506$ e $r=0,501$ respectivamente) (**Figuras 89-92**). Todas as proteínas analisadas apresentaram correlação moderada com SAA1.

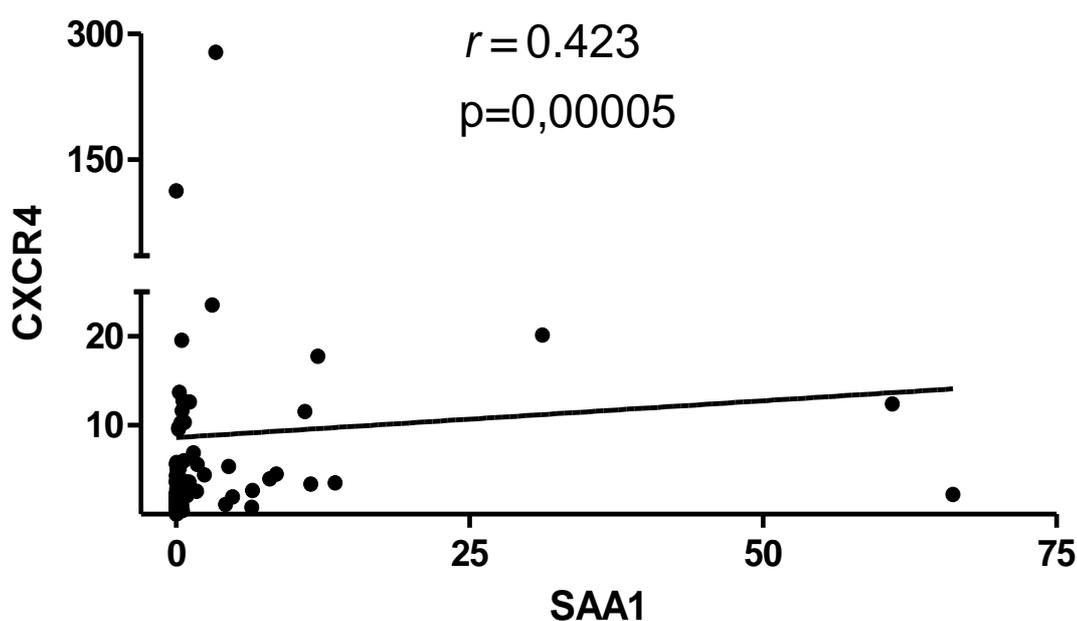


Figura 89: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de CXCR4 em tecido cerebral de 86 pacientes com GBM. Quantificação foi realizada por qRT-PCR. Dados foram analisados no software SPSS.

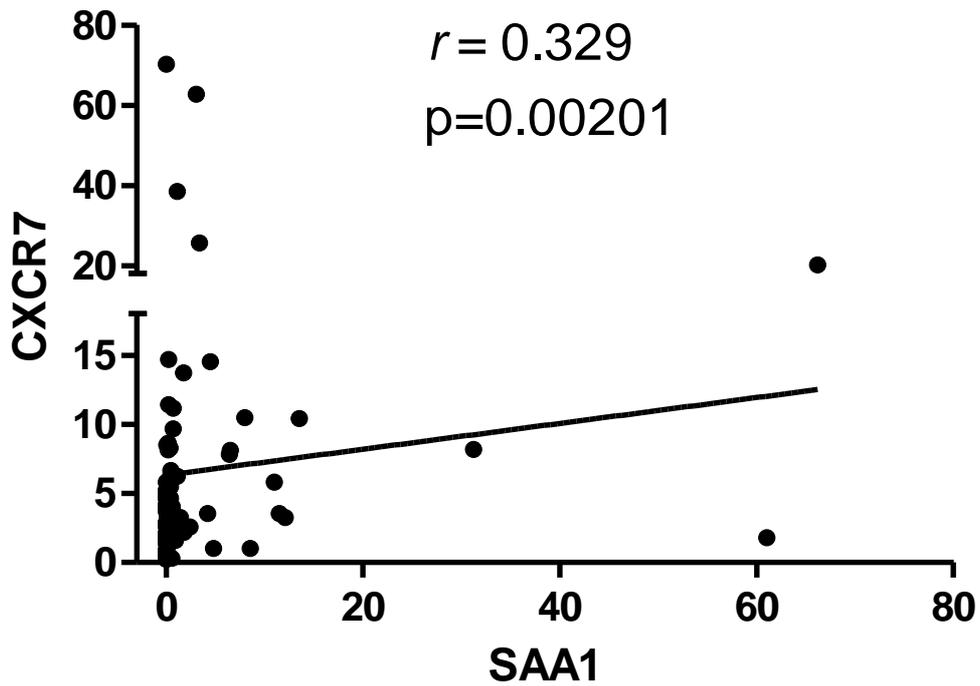


Figura 90: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de CXCR7 em tecido cerebral de 86 pacientes com GBM. Quantificação foi realizada por qRT-PCR. Dados foram analisados no software SPSS.

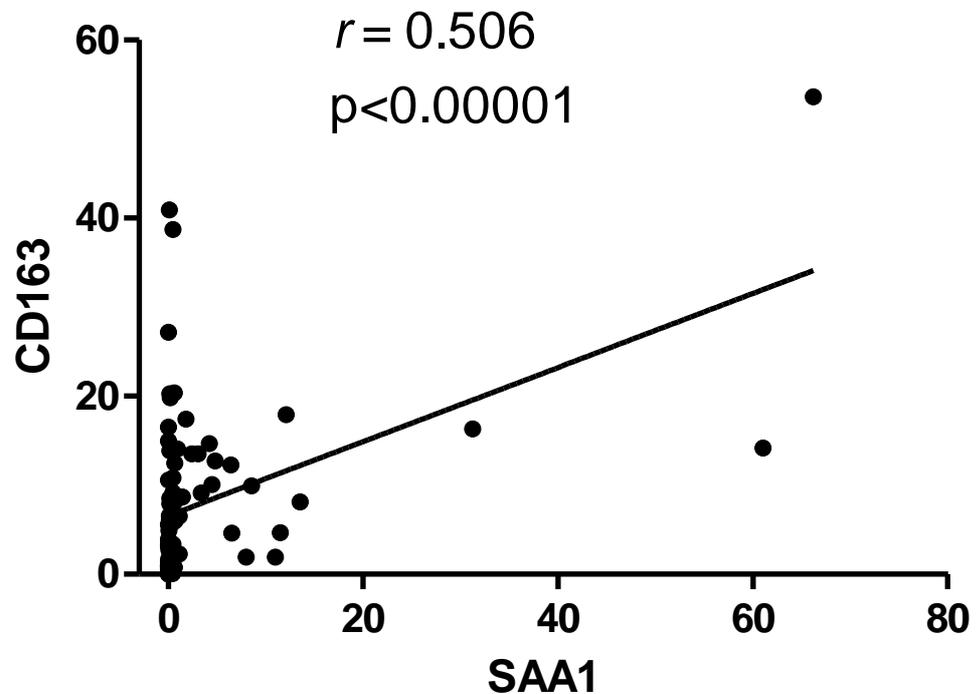


Figura 91: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de CD163 em tecido cerebral de 83 pacientes com GBM. Quantificação foi realizada por qRT-PCR. Dados foram analisados no software SPSS.

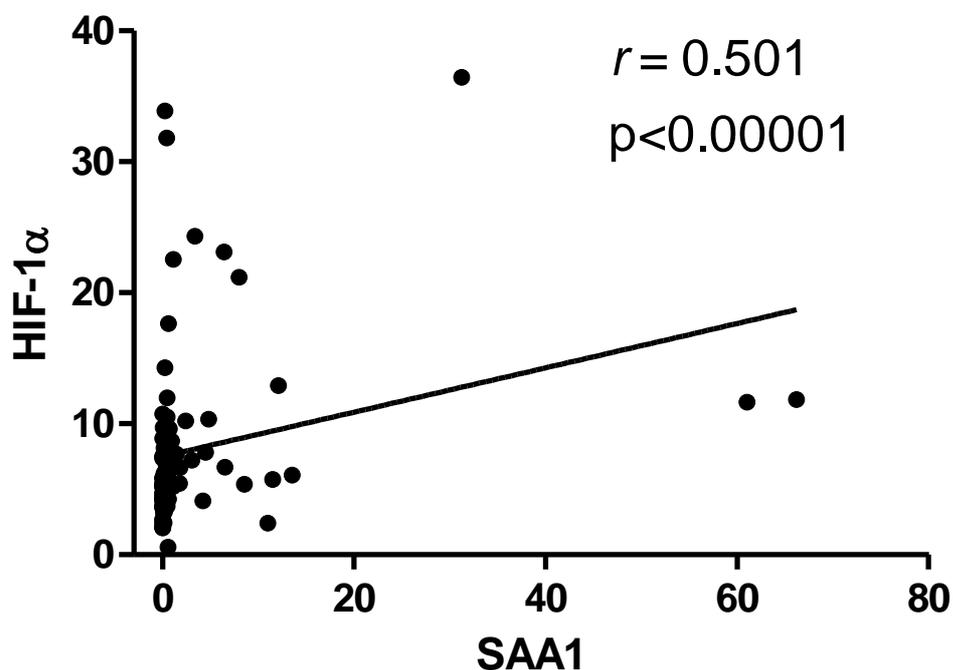


Figura 92: Correlação positiva da expressão de SAA1 versus expressão de HIF-1 α em tecido cerebral de 86 pacientes com GBM. Quantificação foi realizada por qRT-PCR. Dados foram analisados no software SPSS.

Estudos indicam que células tumorais expressam receptores para quimiocinas (Moore, 2001). O receptor de quimiocina CXCR4 foi sugerido como biomarcador prognóstico em gliomas (Furusato et al., 2010) e relacionado à migração de células tumorais (Qu et al., 2013). Expressão aumentada de CXCR4 em pacientes com câncer está relacionada a um fenótipo mais agressivo e por este motivo o mesmo foi identificado como um potencial alvo terapêutico em casos avançados de câncer de próstata metastático (Darash-Yahana et al., 2004). Silenciamento de CXCR4 mostrou completa inibição da proliferação do glioma (Calatuzzolo et al., 2011).

O receptor CXCR7 também é um receptor expresso em tumores cerebrais capaz de promover crescimento do tumor, invasão e metástases e, portanto vem sendo correlacionando com a malignidade (Wang et al., 2008; Tang et al., 2012). A molécula CD163 é uma proteína de membrana presente em monócitos e macrófagos (Van den Heuvel et al., 1999) que tem sido utilizada como um parâmetro de diagnóstico para monitorar ativação de macrófagos em condição inflamatória, ou seja, associado ao tumor e, uma vez associado ao tumor auxilia na resistência das células tumorais ao tratamento (Lu-Emerson et al., 2013). Expressão aumentada de

CD163 é uma característica de tecidos que apresentam macrófagos e respondem à inflamação (Etzerodt & Moestrup, 2013).

O HIF-1 α é um regulador chave da resposta celular à hipóxia em muitos tipos de câncer, inclusive em gliomas, regulando positivamente a expressão de CXCR4, induzindo aumento de proliferação, resistência a apoptose e invasão local, facilitando a sobrevivência e escape do tumor (Zagzag et al., 2006) . Este fator encontra-se elevado em inúmeros tipos de tumores, inclusive em glioblastomas multiformes, devido ao comportamento agressivo, presença de necrose e angiogênese inadequada (Kaur et al., 2005). Vias indutoras de hipóxia regulam diversos processos biológicos, incluindo angiogênese, proliferação celular, metabolismo, sobrevivência, apoptose e migração. Em condições de hipóxia há indução da atividade angiogênica pela ativação da transcrição do gene VEGF (Boudreau & Myers, 2003) com o objetivo de fornecer oxigênio e nutrientes aos tumores em crescimento (Subarsky & Hill, 2003).

A correlação entre a expressão de SAA1 em GBM e sua malignescência clinicamente determinada sugere que SAA é um potencial biomarcador para a severidade dos tumores, um novo marcador da inflamação relacionada ao câncer e malignescência do glioma e um potencial alvo terapêutico para o grau mais avançado dos gliomas.

7 Conclusões

Nossos resultados em conjunto sugerem que SAA é um mediador inflamatório capaz de induzir moléculas importantes para a progressão do tumor, como ROS, MMPs e a sua própria transcrição, bem como seqüências de sinalização celular (MAPK, NF κ B, NO e Ras), regulando diferentes processos celulares no contexto do câncer, incluindo proliferação e mobilidade celular. A natureza multiligante da SAA para diferentes receptores e as diferenças genéticas dos gliomas possivelmente contribuem para a ativação de diferentes vias de sinalização, bem como diferentes respostas. Outros mediadores inflamatórios como TGF- β (Talar & Czyz, 2013; Principe et al., 2014), NO (Choudhari et al., 2013), TNF (Waters, Pober & Bradley, 2013; Landskron et al., 2014), HMGB1 (Bassi et al., 2008; Kang et al., 2013) e IL-6 (Naka et al., 2002; Trikha et al., 2003; Yang et al., 2003; Wallner et al., 2006; Mumm & Oft 2008), dentre outros também tem sido descritos por sinalizar através de diferentes receptores e diferentes vias, induzindo diferentes respostas. Não somente ligantes, mas também receptores induzem efeitos duais (Schmidt et al., 2000; Ibrahim et al., 2013) em processos importantes para o tumor.

SAA foi descrita como uma proteína ligante para RAGE (Cai et al., 2007; Okamoto et al., 2008). Neste estudo nós mostramos que SAA é um ligante endógeno para RAGE e que rSAA induziu a expressão de RAGE em células T98G, sugerindo o envolvimento da via SAA-RAGE na progressão de células T98G. Além disso, mostramos pela primeira vez que SAA4 é um gene importante para a invasividade dos GBM, observamos a participação do mesmo na manutenção da proliferação, morfologia, migração e invasão dos GBM, bem como mostramos que SAA4 pode ser induzida por rSAA e IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Além disto, estas citocinas foram capazes de induzir também os diferentes genes da SAA, sugerindo a existência de múltiplos mecanismos intracelulares retroalimentados (**Figura 93**).

É conhecido que células tumorais produzem fatores de crescimento para a sustentação do próprio tumor. *Knockdowns* dos diferentes genes da SAA indicam que a função biológica da SAA produzida pelo tumor consiste na manutenção do perfil invasivo dos GBM. Além disso observamos que em KDs a adição de SAA exógena consegue reverter apenas parcialmente estes processos sugerindo que nível basal da SAA endógeno é necessária para a existência dos efeitos da SAA exógena.

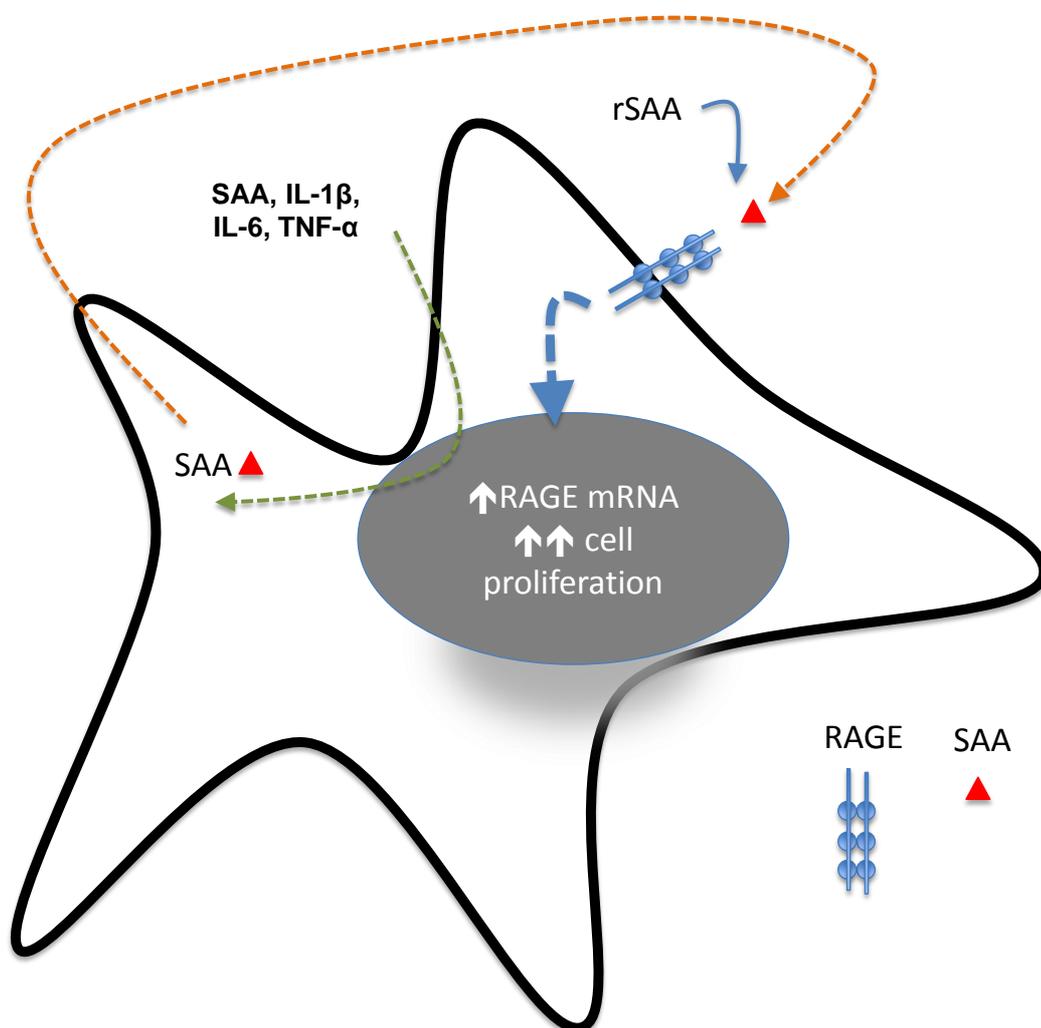


Figura 93: Mecanismo de ação da SAA em GBM. SAA e citocinas pró-inflamatórias estimulam a expressão de SAA (verde). SAA exógena ou endógena pode se ligar a RAGE (laranja), estimular a expressão do mesmo e estimular a proliferação celular.

De maneira inédita mostramos que pacientes com GBM apresentaram aumento significativo na transcrição e expressão de SAA1 no tecido tumoral, bem como aumento sérico de SAA. A correlação na expressão de SAA1 com moléculas importantes para progressão tumoral, como a CXCR4, CXCR7, CD163 e HIF-1 α identificam SAA como possível marcador de malignidade de glioblastomas.

6 Referências Bibliográficas

ABE, R & YAMAGISHI, S. AGE-RAGE system and carcinogenesis. **Curr Pharm Des**, v.14, p.940-945, 2008.

ABBAS, A. K., LICHTMAN, H., PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. Filadelfia: Saunders Elsevier, 6^a ed., v.17, p.397-417, 2007.

ABBRACCHIO MP, CERUTI S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. **Purinergic Signal**, v.2, p.595-604, 2006.

AGGARWAL BB, NATARAJAN K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur Cytokine Netw**, v.7, p. 93-124, 1996.

AGGARWAL BB, SHISHODIA S. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. **Ann N Y Acad Sci**, v.1030, p.434-41, 2004.

AILHAUD, G. Adipose cell differentiation in culture. **Mol Cell Biochem**, v.49, p.17-31, 1982.

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M.G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.18, p.3-10, 2008.

AMANO, H.; ITO, Y.; SUZUKI, T.; KATO, S.; MATSUI, Y.; OGAWA, F.; MURATA, T.; SUGIMOTO, Y.; SENIOR, R.; KITASATO, H.; HAYASHI, I.; SATOH, Y.; NARUMIYA, S.; MAJIMA, M. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis. **Cancer Science**, v.100, n.12, p.2318-2324, 2009.

AUTRÉAUX, B.D', TOLEDANO, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v.8, p.813–824, 2007.

BADOLATO, R.; WANG, J.M.; MURPHY, W.J.; LLOYD, A.R.; MICHIEL, D.F.; BAUSSERMAN, L.L.; KELVIN, D.J.; OPPENHEIM, J.J. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.180, n.1, p.203-209, 1994.

BAI HY, LI AP. P2X(7) receptors in cerebral ischemia. **Neurosci Bull**, v. 29, p.390-8, 2013.

BAJETTO, A., BARBERO, S., BONAVIA, R., PICCIOLI, P., PIRANI, P., FLORIO, T., SCHETTINI, G. Stromal cell-derived factor-1a induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. **J. Neurochem**, v.77, p.1226–1236, 2001.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, n.2, p.135–141, 2002.

BARANOVA, I.N.; VISHNYAKOVA, T.G.; BOCHAROV, A.V.; KURLANDER, R.; CHEN, Z.G.; KIMELMAN, M.L.; REMALEY, A.T.; CSAKO, G.; THOMAS, F.; EGGERMAN, T.L.; PATTERSON, A.P. Serum amyloid a binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII Analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.9, p.8031–8040, 2005.

BARANOVA IN., BOCHAROV AV., VISHNYAKOVA TG. ET AL. CD36 Is a Novel Serum Amyloid A (SAA) Receptor Mediating SAA Binding and SAA-induced Signaling in Human and Rodent Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.11, p.8492-8506, 2010.

BARBERO, S., BAJETTO, A., BONAVIA, R., PICCIOLI, P., FLORIO, P.P.T., SCHETTINI, G. Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor1 in human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vivo. **N.Y. Acad. Sci**, v.973, p.60–69, 2002.

BARBIN, A.; OHGAKI, H.; NAKAMURA, J.; KURRER, M.; KLEIHUES, P.; SWENBERG, J. Endogenous deoxyribonucleic acid (DNA) damage in human tissues: a comparison of ethenobases with aldehydic DNA lesions. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.12, p.1241–1247, 2003.

BASSI, R., ET AL., HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration. **J Neurooncol**, v.87, n.1, p.23-33, 2008.

BAUER EM, SHAPIRO R, BILLIAR TR, BAUER PM. High mobility group Box 1 inhibits human pulmonary artery endothelial cell migration via a Toll-like receptor 4- and interferon response factor 3-dependent mechanism(s). **J Biol Chem**, v.288, n.2, p.1365-73, 2013.

BECKER, E.L.; FOROUHAR, F.A.; GRUNNET, M.L.; BOULAY, F.; TARDIF, M.; BORMANN, B.J.; SODJA, D.; YE, R.D.; WOSKA, J.R.; MURPHY, P.M. Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. **Cell & Tissue Research**, v.292, n.1, p.129–135, 1998.

BERGER B, CAPPER D, LEMKE D, PFENNING PN, PLATTEN M, WELLER M, VON DEIMLING A, WICK W, WEILER M. Defective p53 antiangiogenic signaling in glioblastoma. **Neuro Oncol**, v.12, n.9, p.894-907, 2010.

BHARAT, B. A., SHISHIR. S., SANTOS, K. S., MANOJ, K. P., GAUTAM, S. Inflammation and Cancer: how hot is the link? **J. Biochemical Pharmacology**, v.72, p.1605-1621, 2006.

BHAT-NAKSHATRI P, SWEENEY CJ, NAKSHATRI H. Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells. **Oncogene**, v.27, p.2066-78, 2002.

BIRAN, H.; FRIEDMAN, N.; NEUMANN, L.; PRAS, M.; SHAINKIN-KESTENBAUM, R. Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. **Journal of Clinical Pathology**, v.39, p.794-797, 1986.

BJORKMAN L; KARLSSON J; KARLSSON A; RABIET MJ; BOULAY F; FU H; BYLUND J; DAHLGREN C. Serum amyloid A mediates human neutrophil production of reactive oxygen species through a receptor independent of formyl peptide receptor like-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n.2, p.245-253, 2008.

BLÁZQUEZ, C.; SALAZAR, M.; CARRACEDO, A.; LORENTE, M.; EGIA, A.; GONZALEZ-FERIA, L.; HARO, A.; VELASCO, G.; GUZMAN, M. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. **Cancer Research**, v.68, n.6, p.1945-1952, 2008.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, p.907-916, 2001.

BONDY ML, SCHEURER ME, MALMER B, ET AL; Brain Tumor Epidemiology Consortium. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. **Cancer**. v.113, p.1953-68, 2008.

BOS JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res**, v.49, p.4682–4689, 1989.

BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res**, v.5, p.140-146, 2003.

BOULOS, S., MELONI, B.P., ARTHUR, P.G., MAJDA, B., BOJARSKI, C., KNUCKEY, N.W. Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury. **Neurobiol. Dis**. v.25, p.54–64, 2007.

BOZINOVSKI, S.; HUTCHINSON, A.; THOMPSON, M.; MACGREGOR, L.; BLACK, J.; GIANNAKIS, E.; KARLSSON, A. S.; SILVESTRINI, R.; SMALLWOOD, D.; VLAHOS, R.; IRVING, L. B.; ANDERSON, G. P. Serum

amyloid a is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v.177, p.269–78, 2008.

BRADFORD, M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" **Anal. Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

BRETT, J.; SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; ZOU, Y.S.; WEIDMAN, E.; PINSKY, D.; NOWYGRAD, R.; NEEPER, M.; PRZYSIECKI, C.; SHAW, A. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **American Journal of Pathology**, v.143, p.1699–1712, 1993.

BREW K; DINAKARPANDIAN D & NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v.1477, p.267-283, 2000.

BROHOLM, H., RUBIN, I., KRUSE, A., BRAENDSTRUP, O., SCHMIDT, K., SKRIVER, E.B., LAURITZEN, M. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in human brain tumors. **Clin. Neuropathol**, v.22, p.273–281, 2003.

BRUMMER, O.; BOHMER, G.; HOLLWITZ, B.; FLEMMING, P.; PETRY, K.U.; KUHNLE, H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation: an immunohistochemical study. **Gynecologic Oncology**, v.84, n.2, p.222-227, 2002.

BYTS, N., SAMOYLENKO, A., WOLDT, H., EHRENREICH, H., SIREN, A.L. Cell type specific signalling by hematopoietic growth factors in neural cells. **Neurochem. Res.** v.31, p.1219–1230, 2006.

CAI, H.; SONG, C.; ENDOH, I.; GOYETTE, J.; JESSUP, W.; FREEDMAN, S.B.; MCNEIL, H.P.; GECZY, C.L. Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. **Journal of Immunology**, v.178, p.1852–1860, 2007.

CAI X, FREEDMAN SB, WITTING PK. Serum amyloid A stimulates cultured endothelial cells to migrate and proliferate: inhibition by the multikinase inhibitor BIBF1120. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.40, p.662-70, 2013.

CALATOZZOLO C, CANAZZA A, POLLO B, DI PIERRO E, CIUSANI E, MADERNA E, SALCE E, SPONZA V, FRIGERIO S, DI MECO F, SCHINELLI S, SALMAGGI A. Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. **Cancer Biol Ther**, v.11, p.242-53, 2011.

CHAN DC, CHEN CJ, CHU HC ET AL. Evaluation of serum amyloid A as a biomarker for gastric cancer. **Ann Surg Oncol**, v.14, p.84–93, 2007.

CHEN CL, LIN TS, TSAI CH, WU CC, CHUNG T, CHIEN KY, WU M, CHANG YS, YU JS, CHEN YT. Identification of potential bladder cancer markers in urine

by abundant-protein depletion coupled with quantitative proteomics. **J Proteomics**, v.85, p.28-43, 2013.

CHENG N, HE R, TIAN J, YE PP, YE RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. **J Immunol**, v.181, p.22-6, 2008.

CHENG P, ALBERTS I, LI X. The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. **Int J Dev Neurosci**, v.31, p.783-9, 2013.

CHETRAM, MA; DON-SALU-HEWAGE, AS & HINTON, CV. ROS enhances CXCR4-mediated functions through inactivation of PTEN in prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.410, n.2, P.195-200, 2011.

CHIU WT, SHEN SC, CHOW JM, LIN CW, SHIA LT, CHEN YC. Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE(2) activation. **Neurobiol Dis**, v.37, p.118-29, 2010.

CHO W. C. S., YIP T. T. C., YIP C. ET AL., Identification of serum amyloid a protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling, **Clinical Cancer Research**, vol. 10, n. 1, p.43-52, 2004.

CHO WC, YIP TT, CHENG WW, AU JS. Serum amyloid A is elevated in the serum of lung cancer patients with poor prognosis. **Br J Cancer**, v.102, p.1731-5, 2010.

CHOUDHARI SK, CHAUDHARY M, BAGDE S, GADBAIL AR, JOSHI V. Nitric oxide and cancer: a review. **World J Surg Oncol**, v.11, p.118, 2013.

CHUNG SW, COOPER CR, FARACH-CARSON MC, OGUNNAIKE BA. A control engineering approach to understanding the TGF- β paradox in cancer. **J R Soc Interface**, v.71, p.1389-97, 2011.

COCCO E, BELLONE S, EL-SAHWI K ET AL. Serum amyloid A (SAA): a novel biomarker for uterine serous papillary cancer. **Br J Canc**, v.101, p.335-341, 2009.

COCCO E, BELLONE S, EL-SAHWI K ET AL Serum amyloid A: a novel biomarker for endometrial cancer. **Cancer**, v.116, p.843-851, 2010.

COLOTTA, F., ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C., & MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v.30, p.1073-1081, 2009.

CONNOLLY M, MARRELLI A, BLADES M, MCCORMICK J, MADERNA P, CATHERINE GODSON, MULLAN R, FITZGERALD O, BRESNIHAN B, PITZALIS C, VEALE DJ, FEARON U. Acute Serum Amyloid A Induces Migration, Angiogenesis, and Inflammation in Synovial Cells In Vitro and in a Human Rheumatoid Arthritis/SCID Mouse Chimera Model. **J Immunol**, v.184, p.6427-6437, 2010.

CONNOLLY M, VEALE DJ, FEARON U. Acute serum amyloid A regulates cytoskeletal rearrangement, cell matrix interactions and promotes cell migration in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v.70, p.1296-1303, 2011.

CONNOLLY M, MULLAN R H, MCCORMICK J, MATTHEWS C, SULLIVAN O, KENNEDY A, FITZGERALD O, POOLE A R, BRESNIHAN B, VEALE D J, AND FEARON U. Acute-Phase Serum Amyloid A Regulates Tumor Necrosis Factor and Matrix Turnover and Predicts Disease Progression in Patients With Inflammatory Arthritis Before and After Biologic Therapy. **ARTHRITIS & RHEUMATISM**. Vol. 64, No. 4, April 2012, pp 1035–1045.

COOK, J.A., GIUS, D., WINK, D.A., KRISHNA, M.C., RUSSO, A., MITCHELL, J.B. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment, **Semin. Radiat. Oncol**, v.14, p.259–266, 2004.

CORDES, N.; HANSMEIER, B.; BEINKE, C.; MEINEKE, V.; VAN BEUNINGEN, D. Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. **British Journal of Cancer**, v.89, n.11, p.2122-2132, 2003.

CORREA, T.C.S.; BROHEM, C.A.; WINNISCHOFER, S.M.B.; CARDEAL, L.B.S.; SASAHARA, R.M.; TABOGA, S.R.; SOGAYAR, M.C.; MARIA-ENGLER, S.S. Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.99, n.1, p.156-167, 2006.

COSTA FF, COLIN C, SHINJO SMO, ZANATA SM, MARIE SKN, ET AL. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters**, v.380, p.260-264, 2005.

CULLIS ER, KALBER TL, ASHTON SE, CARTWRIGHT JE, GRIFFITHS JR, RYAN AJ, ROBINSON SP. Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. **Microvasc Res**, v.71, p.76 – 84, 2006.

DAI, C., LYUSTIKMAN, Y., SHIH, A., HU, X., FULLER, G.N., ROSENBLUM, M., HOLLAND, E.C. The characteristics of astrocytomas and oligodendrogliomas are caused by twodistinct and interchangeable signaling formats. **Neoplasia**, v.7, p.397–406, 2005.

DAI S, SODHI C, CETIN S, RICHARDSON W, BRANCA M, NEAL MD, PRINDLE T, MA C, SHAPIRO RA, LI B, WANG JH, HACKAM DJ. Extracellular high mobility group box-1 (HMGB1) inhibits enterocyte migration via activation of Toll-like receptor-4 and increased cell-matrix adhesiveness. **J Biol Chem**, v.285, p.4995-5002, 2010.

DARASH-YAHANA M, PIKARSKY E, ABRAMOVITCH R, ZEIRA E, PAL B, KARPLUS R, BEIDER K, AVNIEL S, KASEM S, GALUN E, PELED A. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. **FASEB J**, v.18, p.1240-2, 2004.

DE ANDRADE, M.; BARNHOLTZ, J.S.; AMOS, C.I.; ADATTO, P.; SPENCER, C.; BONDY, ML. Segregation analysis of cancer in families of glioma patients. **Genetic Epidemiology**, v.20, n.2, p.258–270, 2001.

DE OLIVEIRA EM, SANDRI S, KNEBEL FH, CONTESINI CG, CAMPA A, FILIPPIN-MONTEIRO FB. Hypoxia increases serum amyloid A3 (SAA3) in differentiated 3T3-L1 adipocytes. **Inflammation**, v.36, p.1107-10, 2013.

DE SANTO C, ARSCOTT R, BOOTH S, KARYDIS I, JONES M, ASHER R, SALIO M, MIDDLETON M, CERUNDOLO V. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. **Nat Immunol**, v.11, p.1039-46, 2010.

DEMUTH T, BERENS ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol**, v.70, n.2, p.217-228, 2004.

DIAMANDIS EP. Identification of serum amyloid a protein as a potentially useful biomarker for nasopharyngeal carcinoma. **Clin Cancer Res**, v.10, p.5293, 2004.

DICKINSON, B. C., CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nat. Chem. Biol**, v.7, p.504–511, 2011.

DOLECEK TA, PROPP JM, STROUP NE, KRUCHKO C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. **Neuro Oncol**, v.14, p.1-49, 2012.

DUAN S, ANDERSON CM, KEUNG EC, CHEN Y, CHEN Y, SWANSON RA. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. **J Neurosci**, v.23, p.1320–1328, 2003.

EDWARDS LA, VERREAULT M, THIESSEN B, DRAGOWSKA WH, HU Y, YEUNG JHF, DEDHAR S AND BALLY MB. Combined inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways results in synergistic effects in glioblastoma cells. **Mol Cancer Ther**, v.5, p.645-654, 2006.

EKLUND KK, NIEMI K, KOVANEN PT. Immune functions of serum amyloid A. **Crit Rev Immunol**, v.32, p.335-48, 2012.

ETZERODT A, MOESTRUP SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. **Antioxid Redox Signal**, v.18, p.2352-63, 2013.

FILIPPIN-MONTEIRO FB, DE OLIVEIRA EM, SANDRI S, KNEBEL FH, ALBUQUERQUE RC, ET AL. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. **International Journal of Obesity**, v.1, p.1-8, 2011.

FINDEISEN P, ZAPATKA M, PECCERELLA T, MATZK H, NEUMAIER M, SCHADENDORF D, UGUREL S. Serum amyloid A as a prognostic marker in melanoma identified by proteomic profiling. **J Clin Oncol**, v.27, p.2199-208, 2009.

FISCHER K, THEIL G, HODA R, FORNARA P. Serum amyloid A: a biomarker for renal cancer. **Anticancer Res**, v.32, p.1801-4, 2012.

FITZPATRICK B, MEHIBEL M, COWEN RL, STRATFORD IJ. iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. **Nitric Oxide**, v.19, p.217-24, 2008.

FRANCO, AG, SANDRI S, CAMPA A. High-density lipoprotein prevents SAA-induced production of TNF-alpha in THP-1 monocytic cells and peripheral blood mononuclear cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, p.986-992, 2011.

FU, X.; KASSIM, S.Y.; PARKS, W.C.; HEINECKE, J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7): a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.44, p.41279-41287, 2001.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.521–534, 2006.

FURLANETO, C.J.; CAMPA, A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α (interleukin-1b, and interleukin-8 by human blood neutrophil. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.268, p.405-408, 2000.

FURLANETO, C.J.; RIBEIRO, F.P.; HATANAKA, E.; SOUZA, G.M.; CASSATELLA, M.A.; CAMPA, A. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. **Lipids**, v.37, n.9, p.925-928, 2000.

FURUSATO B, MOHAMED A, UHLÉN M, RHIM JS. CXCR4 and cancer. **Pathol Int**, v.60, p.497-505, 2010.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.340, p.448–454, 1999.

GAO N, SHENL, ZHANG Z, LEONARD S, HE H, ZHANG XG, SHI X, JIANG BH. Arsenite induces HIF-1 α and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells, **Mol. Cell. Biochem**, v.255, p.33-45, 2004.

GILBERT M R, DIGNAM J, WONM, ET AL. RTOG0825: phase III double-blind placebo-controlled trial evaluating bevacizumab (Bev) in patients (Pts) with newly diagnosed glioblastoma (GBM). **J Clin Oncol**, v.31(suppl):1, 2013.

GLOJNARIC, I., CASL, M.T., SIMIC, D., LUKAC, J. Serum amyloid A (SAA) in colorectal carcinoma. **Clin Chem Lab Med**, v.39, p.129-133, 2001.

GUILLEVIN, R.; MENUUEL, C.; DUFFAU, H.; KUJAS, M.; CAPELLE, L.; AUBERT, A.; TAILLIBERT, S.; IDBAIH, A.; PALLUD, J.; DEMARCO, G.; COSTALAT, R.; HOANG-XUAN, K.; CHIRAS, J.; VALLÉ, J.N. Proton magnetic resonance spectroscopy predicts proliferative activity in diffuse low-grade gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v.87, n.2, p.181-187, 2008.

GUPTA P, GHOSH S, NAGARAJAN A, MEHTA VS, SEN E. β -defensin-3 negatively regulates TLR4-HMGB1 axis mediated HLA-G expression in IL-1 β treated glioma cells. **Cell Signal**, v.25, p.682-9, 2013.

GUTFELD, O.; PRUS, D.; ACKERMAN, Z.; DISHON, S.; LINKE, R.P.; LEVIN, M.; URIELI-SHOVAL, S. Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.54, n.1, p.63–73, 2006.

HAGIHARA K, NISHIKAWA T, ISOBET, SONG J, SUGAMATA Y, YOSHIZAKI K. IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.314, p.363-369, 2004.

HANISCH UK, KETTENMANN H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci**, v.10, p.1387-94, 2007.

HANSEN MT, FORST B, CREMERS N, QUAGLIATA L, AMBARTSUMIAN N, GRUM-SCHWENSEN B, KLINGELHÖFER J, ABDUL-AL A, HERRMANN P, OSTERLAND M, STEIN U, NIELSEN GH, SCHERER PE, LUKANIDIN E, SLEEMAN JP, GRIGORIAN M. A link between inflammation and metastasis:

serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4. **Oncogene**, 2014.

HARA A, OKAYASU I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. **Acta Neuropathol**, v.108, p.43-8, 2004.

HARADA, M.; HABATA, Y.; HOSOYA, M.; NISHI, K.; FUJII, R.; KOBAYASHI, M.; HINUMA, S. N-formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.324, n.1, p.255–261, 2004.

HATANAKA, E.; FURLANETO, C.J.; RIBEIRO, F.P.; SOUZA, G.M.; CAMPA, A. Serum amyloid A induced mRNA expression and release of TNF- α in human neutrophils. **Immunology Letters**, v.91, n.1, p.33-37, 2004.

HATANAKA, E.; RIBEIRO, F.P.; CAMPA, A. The acute phase protein serum amyloid A primes neutrophils. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.38, p.81-84, 2003.

HATANAKA, E.; MONTEAGUDO, P.T.; MARROCOS, M.S.; CAMPA, A. Interaction between serum amyloid A and leukocytes - a possible role in the progression of vascular complications in diabetes. **Immunology Letters**, v.108, n.2, p.160-166, 2007.

HATANAKA E.; DERMARGOS A.; ARMELIN HA.; CURI R.; CAMPA A. Serum amyloid A induces reactive oxygen species (ROS) production and proliferation of fibroblast. **Clin Exp Immunol**, v.163, p.362-7, 2011.

HE, R; SANG, HR; YE, RD. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. **BLOOD**, v.101, n.4, p.1572-1581, 2003.

HE RL, ZHOU J, HANSON CZ, CHEN J, CHENG N, YE RD. Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. **Blood**, v.113, p.429-37, 2009.

HOESEL B, SCHMID JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v.12, p.86, 2013.

HOLLAND, E.C. Glioblastoma multiforme: the terminator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.12, p.6242-6244, 2000.

HOLLAND EC, CELESTINO J, DAI C, SCHAEFER L, SAWAYA RE AND FULLER GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. **Nat Genet**, v.25, p.55-57, 2000.

HONG, D.S.; ANGELO, L.S.; KURZROCK, R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. **Cancer**, v.110, n.9, p.1911-1928, 2007.

HOTTINGER AF, KHAKOO Y. Update on the management of familial central nervous system tumor syndromes. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v.7, p.200-207, 2007.

HOWARD, B.A.; WANG, M.Z.; CAMPA, M.J.; CORRO, C.; FITZGERALD, M.C.; PATZ, E.F. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis. **Proteomics**, v.3, p.1720–1724, 2003.

HSIAO CC, KAO YH, HUANG SC, CHUANG JH. Toll-like receptor-4 agonist inhibits motility and invasion of hepatoblastoma HepG2 cells in vitro. **Pediatr Blood Cancer**, v.60, p.248-53, 2013.

HSIEH, H.L., WANG, H.H., WU, W.B., CHU, P.J., YANG, C.M. Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF-kappaB pathways. **J. Neu-roinflam**, v.7, p.88, 2010.

IBRAHIM ZA, ARMOUR CL, PHIPPS S, SUKKAR MB. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? **Mol Immunol**, v.56, p.739-44, 2013.

JANZARIK WG, KRATZ CP, LOGES NT, OLBRICH H, KLEIN C, SCHAFER T, SCHEURLEN W, ROGGENDORF W, WEILLER C, NIEMEYER C, KORINTHENBERG R, PFISTER S, OMRAN H. Further evidence for a somatic KRAS mutation in a pilocytic astrocytoma. **Neuropediatrics**, v.38, p.61–63, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2006. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.56, n.2, p.106–130, 2006.

JENKINS DC, CHARLES IG, THOMSEN LL, MOSS DW, HOLMES LS, BAYLIS SA, RHODES P, WESTMORE K, EMSON PC, MONCADA S. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.92, p.4392 – 4396, 1995.

JIJON HB; MADSEN KL; WALKER JW; ET AL. Serum Amyloid A activates NF-kappa B and proinflammatory gene expression in human and murine intestinal epithelial cells. **European Journal of Immunology**, v.35, n.3, p.718-726, 2005.

KANG R, ZHANG Q, ZEH HJ, LOTZE MT, TANG D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? **Clin Cancer Res**, v.19, p.4046-57, 2013.

KANOY Y, ABE T, MASUDA N, AKAHOSHI T. Progression of non-small cell lung cancer: diagnostic and prognostic utility of matrix metalloproteinase-2, C-reactive protein and serum amyloid A. **Oncol Rep**, v.29, p.469-73, 2013.

KAUR B, KHWAJA FW, SEVERSON EA, MATHENY SL, BRAT DJ, VAN MEIR EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. **Neuro Oncol**, v.7, n.2, p.134-153, 2005.

KHAN N., CROMER C. J., CAMPA M., PATZ E. F. JR., Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma, **Cancer**, vol. 101, n. 1, pp. 379-84, 2004.

KLAMPFER L. Cytokines, inflammation and colon cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v.11, p.451-64, 2011.

KNEBEL, Franciele Hinterholz. Ação da amilóide sérica A em linhagens celulares de glioma humano. São Paulo. 2009. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas. Universidade de São Paulo, 2009.

KNEBEL F. H., ALBUQUERQUE R. C., MASSARO R. R., MARIA-ENGLER S. S., CAMPA A. Dual effect of serum amyloid A on the invasiveness of glioma cells. **Mediators of Inflammation**, 2013.

KOSTOUROU V, CARTWRIGHT JE, JOHNSTONE AP, BOULT JK, CULLIS ER, WHITLEY G, ROBINSON SP. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. **Br J Cancer**, v.104, p.83-90, 2011.

KUMON, Y.; SIPE, J.D.; BRINCKERHOFF, C.E.; SCHREIBER, B.M. Regulation of extrahepatic apolipoprotein serum amyloid A (ApoSAA) gene expression by interleukin-1 alpha alone: synthesis and secretion of ApoSAA by cultured aortic smooth muscle cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.46, n.3, p.284-291, 1997.

LAKOTA K, MRAK-POLJSK K, BOZIC B, TOMSIC M, SODIN-SEMRL S. Serum amyloid A activation of human coronary artery endothelial cells exhibits a neutrophil promoting molecular profile. **Microvasc Res**, v.90, p.55-63, 2013.

LAM-HIMLIN D, ESPEY MG, PERRY G, SMITH MA, CASTELLANI RJ. Malignant glioma progression and nitric oxide. **Neurochem Int**, v.49, p.764-8, 2006.

LANDSKRON G, DE LA FUENTE M, THUWAJIT P, THUWAJIT C, HERMOSO MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **J Immunol Res**, 2014.

LE Y, YANG Y, CUI Y, YAZAWA H, GONG W, QIU C, WANG JM. Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets. **Int Immunopharmacol**, v.2, p.1-13, 2002.

LE L, CHI K, TYLDESLEY S ET AL. Identification of serum amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions. **Clin Chem**, v.51, p.695–707, 2005.

LEE, H.Y.; KIM, M.K.; PARK, K.S.; BAE, Y.H.; YUN, J.; PARK, J.I.; KWAK, J.Y.; BAE, Y.S. Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.330, n.3, p.989–998, 2005.

LEE, M.S., YOO, S.A., CHO, C.S., SUH, P.G., KIM, W.U., RYU, S.H. Serum amyloid A binding to formyl peptide receptor-like 1 induces synovial hyperplasia and angiogenesis. **J. Immunol**, v.177, n.8, p.5585-94, 2006.

LEE, H.Y.; KIM, S.D.; SHIM, J.W.; LEE, S.Y.; LEE, H.; CHO, K.H.; YUN, J.; BAE, Y.S. Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes. **Journal of Immunology**, v.181, n.6, p.4332-4339, 2008.

LIN H, XIONG W, ZHANG X, LIU B, ZHANG W, ZHANG Y, CHENG J, HUANG H. Notch-1 activation-dependent p53 restoration contributes to resveratrol-induced apoptosis in glioblastoma cells. **Oncol Rep**, v.26, p.925-30, 2011.

LINKE RP, BOCK V, VALET G, ROTHE G. Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v.176, p.1100–5, 1991.

LIOTTA, L.A.; KOHN, E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v.411, n.6835, p.375-379, 2001.

LIU, N., STOICA, G., YAN, M., SCOFIELD, V.L., QIANG, W., LYNN, W.S., WONG, P.K. ATM deficiency induces oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in astrocytes. **Lab. Invest**, v.85, p.1471–1480, 2005.

LIU J, ZHAN M, HANNAY JA, DAS P, BOLSHAKOV SV, KOTILINGAM D, YU D, LAZAR AF, POLLOCK RE, LEV D. Wild-type p53 inhibits nuclear factor-kappaB-induced matrix metalloproteinase-9 promoter activation: implications for soft tissue sarcoma growth and metastasis. **Mol Cancer Res**, v.4, p.803-10, 2006.

LIU DH, WANG XM, ZHANG LJ ET AL. Serum amyloid A protein: a potential biomarker correlated with clinical stage of lung cancer. **Biomed Environ Sci**, v.20, p.33–40, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LO HW. Targeting Ras-RAF-ERK and its interactive pathways as a novel therapy for malignant gliomas. **Curr Cancer Drug Targets**, v.10, p.840-8, 2010.

LOCATELLI M, FERRERO S, MARTINELLI BONESCHI F, BOIOCCHI L, ZAVANONE M, MARIA GAINI S, BELLO L, VALENTINO S, BARBATI E, NEBULONI M, MANTOVANI A, GARLANDA C. The long pentraxin PTX3 as a correlate of cancer-related inflammation and prognosis of malignancy in gliomas. **J Neuroimmunol**, v.260, p.99-106, 2013.

LOGSDON, C.D., ET AL. RAGE and RAGE ligands in cancer. **Curr Mol Med**, v.7, p.777-89, 2007.

LOIBL S, BUCK A, STRANK C, VON MINCKWITZ G, ROLLER M, SINN HP, SCHINI-KERTH V, SOLBACH C, STREBHARDT K, KAUFMANN M. The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer. **Eur J Cancer**, v.41, p.265–271, 2005.

LU J, YU Y, ZHU I, CHENG Y, SUN PD. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.111, p.5189-94, 2014.

LU-EMERSON C ET AL. Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma, **Neuro Oncol**, v.15, p.1079-1087, 2013.

MADAN, M.; AMAR, S. Toll-like receptor-2 mediates diet and/or pathogen associated atherosclerosis: proteomic findings. **PLoS ONE**, v.3, n.9, art.E3204, 2008.

MAEDA S & OMATA M. Inflammation and cancer: Role of nuclear factor-kappa B activation. **Cancer Sci**. v.99, p.836–842, 2008.

MAHER, E.A.; FURNARI, F.B.; BACHOO, R.M.; ROWITCH, D.H.; LOUIS, D.M.; CAVENEE, W.K.; DEPINHO, R.A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes & Development**, v.15, n.11, p.1311-1333, 2001.

MALLE, E.; SODIN-SEMRLB, S.; KOVACEVICA, A. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.9–26, 2009.

MARTIN, V; HERRERA, F; GARCIA-SANTOS, G; ANTOLIN, I; RODRIGUEZ-BLANCO, J; RODRIGUEZ, C. Signaling pathways involved in antioxidant control

of glioma cell proliferation. **Free Radical Biology and Medicine**. v.42, n.11, p.1715-1722, 2007.

MENDES, O., KIM, H.T., LUNGU, G., STOICA, G. MMP2 role in breast cancer brainmetastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. **Clin. Exp.Metastasis**, v.24, p.341–351, 2007.

MENSCHIKOWSKI M, HAGELGANS A, FUESSEL S, MARENINOVA OA, ASATRYAN L, WIRTH MP, SIEGERT G. Serum amyloid A, phospholipase A₂-IIA and C-reactive protein as inflammatory biomarkers for prostate diseases. **Inflamm Res**, v.62, p.1063-72, 2013.

MICHAELI A, FINCI-YEHESKEL Z, DISHON S, LINKE RP, LEVIN M, ET AL. Serum amyloid A enhances plasminogen activation: Implication for a role in colon cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.368, p.368-373, 2008.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.17, p.501–519, 2006.

MIGITA, K.; KAWABE, Y.; TOMINAGA, M.; ORIGUCHI, T.; AOYAGI, T.; EGUCHI, K. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. **Laboratory Investigation**, v.78, n.5, p.535-539, 1998.

MIGITA K; KOGA T; TORIGOSHI T; MAEDA Y; MIYASHITA T; IZUMI Y; AIBA Y; KOMORI A; NAKAMURA M; MOTOKAWA S; ISHIBASHI H. Serum amyloid A protein stimulates CCL20 production in rheumatoid synoviocytes. **Rheumatology**, v.48, n.7, p.741-747, 2009.

MIYAKOSHI J, YAGI K. Inhibition of I kappaB-alpha phosphorylation at serine and tyrosine acts independently on sensitization to DNA damaging agents in human glioma cells. **Br J Cancer**, v.82, p.28-33. 2000.

MOORE MA. The role of chemoattraction in cancer metastases. **Bioessays**, v.23, p.674-6, 2001.

MOSHKOVSKII S. A., SEREBRYAKOVA M. V., KUTEYKIN-TEPLYAKOV K. B., ET AL. Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1. **Proteomics**, v.5, n. 14, p.3790-7, 2005.

MOSHKOVSKII, S.A, VLASOVA, M.A., PYATNITSKIY, M.A., TIKHONOVA, O.V., SAFAROVA, M.R., MAKAROV, O.V., ARCHAKOV, A.I. Acute phase serum amyloid A in ovarian cancer as an important component of proteome diagnostic profiling. **Proteomics Clin**, v.1, p.107-117, 2007.

MULLAN R, BRESNIHAN B, GOLDEN-MASON L, MARKHAM T, O'HARA R, FITZGERALD O, VEALE D, FEARON U. Acute-Phase Serum Amyloid A Stimulation of Angiogenesis, Leukocyte Recruitment, and Matrix Degradation in Rheumatoid Arthritis Through an NF- κ B-Dependent Signal Transduction Pathway. **Arthritis & Rheumatism**, v.54, n.1, p.105–114, 2006.

MUMM JB & OFT M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. **Oncogene**, v.27, p.5913–5919, 2008.

MUT M, AMOS S, HUSSAINI IM. PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. **Turk Neurosurg**, v.20, p.277-85, 2010.

NAKA T, NISHIMOTO N & KISHIMOTO T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Research**, 4 (Suppl 3) S233–S242, 2002.

NAKAGAWA, T.; KUBOTA, T.; KABUTO, M.; FUJIMOTO, N.; OKADA, Y. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase=type IV collagenase¼gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. **Journal of Neuro-Oncology**, v.28, p.13–24, 1996.

NAVAS-ACIEN, A.; POLLAN, M.; GUSTAVSSON, P.; PLATO, N. Occupation, exposure to chemicals and risk of gliomas and meningiomas in Sweden. **American Journal of Industrial Medicine**, v.42, p.214–227, 2002.

NGUYEN KD, MACAUBAS C, NADEAU KC, TRUONG P, YOON T, LEE T, PARK JL, MELLINS ED. Serum amyloid A overrides Treg anergy via monocytedependent and Treg-intrinsic, SOCS3-associated pathways. **Blood**, v.117, p.3793–8, 2011.

NGUYEN KD, MACAUBAS C, TRUONG P, WANG N, HOU T, YOON T, MELLINS ED. Serum amyloid A induces mitogenic signals in regulatory T cells via monocyte activation. **Mol Immunol**, v.59, p.172-9, 2014.

NISSINEN L, KÄHÄRI VM. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochim Biophys Acta**, v.1840, p.2571-2580, 2014.

O'HARA R, MURPHY EP, WHITEHEAD AS, FITZGERALD O, BRESNIHAN B. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum**, v.50, p.1788-99, 2004.

O'REILLY S, CANT R, CIECHOMSKA M, FINNEGAN J, OAKLEY F, HAMBLETON S, VAN LAAR JM. Serum Amyloid A (SAA) induces IL-6 in dermal fibroblasts via TLR2, IRAK4 and NF- κ B. **Immunology**, 2014.

OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; MIZOGUCHI, A.; ADACHI, E.; SASAHARA, R.M.; NISHIMURA, S.; IMAMURA, Y.; KITAYAMA, H.; ALEXANDER, D.B.; IDE, C.; HORAN, T.P.; ARAKAWA, T.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, S.I.; ITOH, Y.; SEIKI, M.; ITOHARA, S.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v.107, n.6, p.789-800, 2001.

OKAMOTO H; KATAGIRI Y; KIIRE A; ET AL. Serum Amyloid A activates nuclear Factor-kappa B in rheumatoid synovial fibroblasts through binding to receptor of advanced glycation end-products. **Journal of Rheumatology**, v.35, n.5, p.752-756, 2008.

PAGE-MCCAW A, EWALD A J & WERB Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.221-233, 2007.

PARET C, SCHOEN Z, SZPONAR A, KOVACS G. Inflammatory Protein Serum Amyloid A Marks a subset of Conventional Renal Cell Carcinomas with Fatal Outcome. **European Urology**, v.57, p.859-866, 2010.

PARK CM, PARK MJ, KWAK HJ, MOON SI, YOO DH, LEE HC, PARK IC, RHEE CH, HONG SI. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. **Int J Oncol**, v.28, p.119-25. 2006.

PERACAULA R; SARRATS A; RUDD PM. Liver proteins as sensor of human malignancies and inflammation. **Proteomics Clinical Applications**, v.4, n.4, p.426-431, 2010.

PIERCE B. L., BALLARD-BARBASH R., BERNSTEIN L., ET AL., Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients, **J Clin Oncol**, vol. 27, no. 21, p. 3437-44, 2009.

POITOU, C.; VIGUERIE, N.; CANCELLO, R.; DE MATTEIS, R.; CINTI, S.; STICH, V.; COUSSIEU, C.; GAUTHIER, E.; COURTINE, M.; ZUCKER, J.D.; BARSH, G.S.; SARIS, W.; BRUNEVAL, P.; BASDEVANT, A.; LANGIN, D.; CLEMENT, K. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. **Diabetologia**, v.48, n.3, p.519-528, 2005.

PORTER KR, MCCARTHY BJ, FREELS S, KIM Y, DAVIS FG. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. **Neuro Oncol**, v.12, p.520-527, 2010.

PRECIADO-PATT, L.; HERSHKOVIZ, R.; FRIDKIN, M.; LIDER, O. Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoproteins and induces the adhesion of resting CD4⁺ T cells. **Journal of Immunology**, v.156, p.1189-1195, 1996.

PRINCIPE DR, DOLL JA, BAUER J, JUNG B, MUNSHI HG, BARTHOLIN L, PASCHE B, LEE C, GRIPPO PJ. TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v.106, 2014.

QU QX, HUANG Q, XU J, DUAN LT, ZHU YB, ZHANG XG. CD40 signal regulates CXCR4 mediating ovarian carcinoma cell migration: implications for extrapelvic metastatic factors. **Oncol Res**, v.20, p.383-92, 2013.

RA, H.J.; PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology**, v.26, n.8, p.587-596, 2007.

RAO, J.S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nature Reviews Cancer**, v.3, n.7, p.489-501, 2003.

REN Y, WANG H, LU D, XIE X, CHEN X, PENG J, HU Q, SHI G, LIU S. Expression of serum amyloid A in uterine cervical cancer. **Diagn Pathol**, v.21, p.9-16, 2014.

RENCKENS R, ROELOFS JJ, KNAPP S, DE VOS AF, FLORQUIN S, VAN DER POLL T. The acute-phase response and serum amyloid A inhibit the inflammatory response to *Acinetobacter baumannii* pneumonia. **J Infect Dis**, v.193, p.187-95, 2006.

RIBEIRO, F.P.; FURLANETO, C.J.; HATANAKA, E.; RIBEIRO, W.B.; SOUZA, G.M.; CASSATELLA, M.A.; CAMPA, A. mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. **Mediators of Inflammation**, v.12, p.173-178, 2003.

RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; HENRIQUE, CATALANI, L.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. **Journal of Pineal Research**, v.34, p.69-74, 2003.

ROSSMANN C, HAMMER A, KOYANI CN, KOVACEVIC A, SIWETZ M, DESOYE G, POEHLMANN TG, MARKERT UR, HUPPERTZ B, SATTLER W, MALLE E. Expression of serum amyloid A4 in human trophoblast-like choriocarcinoma cell lines and human first trimester/term trophoblast cells. **Placenta**, 2014.

RUBINI P, PAGEL G, MEHRI S, MARQUARDT P, RIEDEL T, ILLES P. Functional P2X7 receptors at cultured hippocampal astrocytes but not neurons. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 2014.

RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, n.2, p.267-285, 2005.

SANDOVAL JA, TURNER KE, HOELZ DJ, RESCORLA FJ, HICKEY RJ, MALKAS LH. Serum protein profiling to identify high-risk neuroblastoma:

preclinical relevance of blood-based biomarkers. **J Surg Res**, v.142, p.268-74, 2007.

SANDRI, S.; HATANAKA, E.; FRANCO, A.G.; PEDROSA, A.M.; MONTEIRO, H.P.; CAMPA, A. Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways. **Immunology Letters**, v.121, n.1, p.22-26, 2008.

SANDRI, S.; RODRIGUEZ, D.; GOMES, E.; MONTEIRO, H.P.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? **Journal of Leukocyte Biology**, v.83, n.5, p.1174-1180, 2008.

SANDRI S, URBAN BORBELY A, FERNANDES I, DE OLIVEIRA EM, KNEBEL FH, RUANO R, ZUGAIB M, FILIPPIN-MONTEIRO F, BEVILACQUA E, CAMPA A. Serum amyloid A in the placenta and its role in trophoblast invasion. **PLoS One**, v.9, 2014.

SARRAZY V, VEDRENNE N, BILLET F, BORDEAU N, LEPREUX S, VITAL A, JAUBERTEAU MO, DESMOULIÈRE A. TLR4 signal transduction pathways neutralize the effect of Fas signals on glioblastoma cell proliferation and migration. **Cancer Lett**, v.311, p.195-202, 2011.

SASAHIRA T, AKAMA Y, FUJII K, KUNIYASU H. Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/amphoterin in colorectal adenomas. **Virchows Arch**, v.446, p.411-5, 2005.

SATO Y, KUROSE A, OGAWA A, OGASAWARA K, TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z, SAWAI T. Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. **Cancer Biol Ther**, v.8, p.452-7, 2009.

SBARDELLA D, FASCIGLIONE GF, GIOIA M, CIACCIO C, TUNDO GR, MARINI S, COLETTA M. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. **Mol Aspects Med**, v.33, p.119-208, 2012.

SCHMIDT AM, YAN SD, YAN SF, STERN DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. **Biochim Biophys Acta**, v.1498, p.99-111, 2000.

SCHWARTZBAUM JA, FISHER JL, ALDAPE KD, WRENSCH M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nat. Clin. Pract. Neurol**, v.2, p.494-503, 2006.

SELZNICK LA, SHAMJI MF, FECCI P, GROMEIER M, FRIEDMAN AH, SAMPSON J. Molecular strategies for the treatment of malignant glioma--genes, viruses, and vaccines. **Neurosurg. Rev**, v.31, p.141-155, 2008.

SHABO I, STÅL O, OLSSON H, DORÉ S, SVANVIK J. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. **Int. J. Cancer**, v.123, p.780–786, 2008.

SHEN SC, WU MS, LIN HY, YANG LY, CHEN YH, CHEN YC. Reactive Oxygen Species-Dependent Nitric Oxide Production in Reciprocal Interactions of Glioma and Microglial Cells. **J Cell Physiol**, 2014.

SHIELS MS, PFEIFFER RM, HILDESHEIM A, ENGELS EA, KEMP TJ, PARK JH, KATKI HA, KOSHIOL J, SHELTON G, CAPORASO NE, PINTO LA, CHATURVEDI AK. Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. **J Natl Cancer Inst**, v.105, p.1871-80, 2013.

SHINODA, J., WHITTLE, I.R. Nitric oxide and glioma: a target for novel therapy? **Br. J. Neurosurg**, v.15, p.213–220, 2001.

SILVEIRA CORRÊA TC ET AL. Reck-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.110, p.52-61, 2009.

SMYTH MJ, CRETNEY E, KERSHAW MH, HAYAKAWA Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. **Immunological Reviews**, v.202, p.275–293, 2004.

SODHI, A.; BISWAS, S.K. fmlp-induced *in vitro* nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v.71, p.262-270, 2001.

SOENGAS MS, ALARCÓN RM, YOSHIDA H, GIACCIA AJ, HAKEM R, MAK TW, LOWE SW. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. **Science**, v.284, p.156-9, 1999.

SOLINAS G, MARCHESI F, GARLANDA C, MANTOVANI A, ALLAVENA P. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.29, p.243–248, 2010.

SONG C, HSU K, YAMEN E, YAN W, FOCK J, WITTING PK, GECZY CL, FREEDMAN SB. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. **Atherosclerosis**, v.207, p.374–33, 2009.

SOUSSI T, WIMAN KG. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. **Cancer Cell**, v.12, p.303-12, 2007.

STEEL DM & WHITEHEAD AS. The Major Acute Phase Reactants: c-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol. Today**, v.15, p.81-88, 1994.

STUPP R, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, ET AL. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v.352, p.987-996, 2005.

SU, S.B.; GONG, W.H.; GAO, J.L.; SHEN, W.P.; MURPHY, P.M.; OPPENHEIM, J.J.; WANG, J.M. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.2, p.395–402, 1999.

SU, C., UNDERWOOD, W., RYBALCHENKO, N., SINGH, M. ERK1/2 and ERK5 have distinct roles in the regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. **J. Neurosci. Res**, v.89, p.1542–1550, 2011.

SUADICANI SO, IGLESIAS R, SPRAY DC, SCEMES E. Point mutation in the mouse P2X7 receptor affects intercellular calcium waves in astrocytes. **ASN Neuro**, 1(1), 2009.

SUBARSKY P & HILL RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. **Clinical & Experimental Metastasis**, v.20, p.237-250, 2003.

SUNG HJ, AHN JM, YOON YH, RHIM TY, PARK CS, PARK JY, LEE SY, KIM JW, CHO JY. Identification and validation of SAA as a potential lung cancer biomarker and its involvement in metastatic pathogenesis of lung cancer. **J Proteome Res**, v.4, p.1383-95, 2011.

TAGUCHI A, BLOOD DC, DEL TORO G, CANET A, LEE DC, QU W, TANJI N, LU Y, LALLA E, FU C, HOFMANN MA, KISLINGER T, INGRAM M, LU A, TANAKA H, HORI O, OGAWA S, STERN DM, SCHMIDT AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. **Nature**, v.405, p.354-60, 2000.

TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.Q.; HORAN, T.P.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.; TAKAI, S.; SASAHARA, R.M.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B.J.; ARAKAWA, T.; NODA, M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.22, p.13221-13226, 1998.

TALAR B, CZYŻ M. [TGF- β signaling pathways in cancers]. **Postepy Hig Med Dosw**, v.67, p.1008-17, 2013.

TANG T, XIA QJ, CHEN JB, XI MR, LEI D. Expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in human brain tumours. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.13, p.5281-6, 2012.

TEWARI R, CHOUDHURY SR, GHOSH S, MEHTA VS, SEN E. Involvement of TNF α -induced TLR4-NF- κ B and TLR4-HIF-1 α feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. **J Mol Med (Berl)**, v.90, p.67-80, 2012.

THEELER BJ, YUNG WK, FULLER GN, DE GROOT JF. Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults. **Neurology**, v.79, p.1917-1926, 2012.

THORN, CF; LU, ZY & WHITEHEAD, AS. Regulation of the human acute phase serum amyloid a genes by tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.59, n.2, p.152-158, 2004.

TRIKHA M, CORRINGHAM R, KLEIN B & ROSSI JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.4653–4665, 2003.

TROTTA T, PORRO C, CALVELLO R, PANARO MA. Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. **J Neuroimmunol**, v.15, p.1-12, 2014.

TSUNEKI, H., MA, E.L., KOBAYASHI, S., SEKIZAKI, N., MAEKAWA, K., SASAOKA, T., WANG, M.W., KIMURA, I. Antiangiogenic activity of beta-eudesmol in vitro and invivo. **Eur. J. Pharmacol**, v.512, p.105–115, 2005.

UHLAR C M, WHITEHEAD A S. The kinetics and magnitude of the synergistic activation of the serum amyloid A promoter by IL-1 beta and IL-6 is determined by the order of cytokine addition. **Scand J Immunol**, v.49, p.399-404, 1999.

UPRAGARIN N, LANDMAN WJM, GAASTRA W, GRUYS E. Extrahepatic production of acute phase serum amyloid A. **Histology and Histopathology**, v.20, p.1295-1307, 2005.

URIELI-SHOVAL, S.; LINKE, R.P.; MATZNER, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Current Opinion in Hematology**, v.7, n.1, p.64-69, 2000.

URIELI-SHOVAL S, FINCI-YEHESKEL Z, DISHON S, GALINSKY D, LINKE RP, ARIEL I, LEVIN M, BEN-SHACHAR I, PRUS D. Expression of serum amyloid a in human ovarian epithelial tumors: implication for a role in ovarian tumorigenesis. **J Histochem Cytochem**, v.58, p.1015-23, 2010.

VADAY, G.G.; LIDER, O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behaviour and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, n.2, p.149-159, 2000.

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v.160, p.1-40, 2006.

VAN DEN HEUVEL MM, TENSEN CP, VAN AS JH, ET AL. Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. **J Leukoc Biol**, v.66, p.858-866, 1999.

VAN MEIR EG, KIKUCHI T, TADA M, LI H, DISERENS AC, WOJCIK BE, HUANG HJS, FRIEDMANN T, DE TRIBOLET N AND CAVENEE WK. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. **Cancer Res**, v.54, p.649-652, 1994.

VILLALBA M, HOTT M, MARTIN C, AGUILA B, VALDIVIA S, QUEZADA C, ZAMBRANO A, CONCHA MI, OTTH C. Herpes simplex virus type 1 induces simultaneous activation of Toll-like receptors 2 and 4 and expression of the endogenous ligand serum amyloid A in astrocytes. **Med Microbiol Immunol**, v.201, p.371-9, 2012.

VOLONTÉ C, APOLLONI S, SKAPER SD, BURNSTOCK G. P2X7 receptors: channels, pores and more. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v.11, p.705-21, 2012.

WALDER, K.; MCMILLAN, J.S.; TREVASKIS, J.; KERR, L.; DE SILVA, A.; SUNDERLAND, T.; GODDE, N.; GAO Y.; BISHARA, N.; WINDMILL, K.; TENNEBROWN, J.; AUGERT, G.; ZIMMET, P.Z.; COLLIER, G.R. Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation? **Diabetes**, v.51, n.6, p.1859–1866, 2002.

WALLNER L, DAI J, ESCARA-WILKE J, ZHANG J, YAO Z, LU Y, TRIKHA M, NEMETH JA, ZAKI MH & KELLER ET. Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an antiinterleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgenindependent phenotype in orchiectomized mice. **Cancer Research**, v.66, p.3087–3095, 2006.

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 Pathology**, v.20, n.2, p.65-72, 2003.

WANG J, SHIOZAWA Y, WANG J, ET AL. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. **J Biol Chem**, 283, 4283-94, 2008.

WANG, JUN-YE; ZHENG, YU-ZHEN; YANG, JUAN; ET AL. Elevated levels of serum amyloid A indicate poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **BMC CANCER**, vol. 12, n. 365, 2012.

WANG Y, GE P, ZHU Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion. **Mediators Inflamm**, 2013.

WANG X, CHEN JX, LIU JP, YOU C, LIU YH, MAO Q. Gain of function of mutant TP53 in glioblastoma: prognosis and response to temozolomide. **Ann Surg Oncol**, v.21, p.1337-44, 2014.

WATERS JP, POBER JS, BRADLEY JR. Tumour necrosis factor and cancer. **J Pathol**, v.230, p.241-8, 2013.

WEINBERG F & CHANDEL NS. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. **Cell. Mol. Life Sci**, v.66, p.3663-3673, 2009.

WICK W, CLOUGHESY TF, NISHIKAWA R, ET AL. Tumor response based on adapted Macdonald criteria and assessment of pseudoprogression (PsPD) in the phase III AVAglio trial of bevacizumab (Bv) plus temozolomide (T) plus radiotherapy (RT) in newly diagnosed glioblastoma (GBM). **J Clin Oncol**, 2013.

WOLSKA A, LECH-MARAÑDA E, ROBAK T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. **Cell Mol Biol Lett**, v.14, p.248-72, 2009.

WONG K, REN XR, HUANG YZ, XIE Y, LIU G, SAITO H, TANG H, WEN L, BRADY-KALNAY SM, MEI L, WU JY, XIONG WC, RAO Y. Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. **Cell**, v.107, p.209–221, 2001.

WU Y, ANTONY S, MEITZLER JL, DOROSHOW JH. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. **Cancer Lett**, v.345, p.164-73, 2014.

XIE K, HUANG S, DONG Z, JUANG S, GUTMAN M, XIE Q, NATHAN C, FIDLER I. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. **J Exp Med**, v.181, p.1333-1343, 1995.

XU Y, LI WL, FU L, GU F, MA YJ. Slit2/Robo1 signaling in glioma migration and invasion. **Neurosci Bull**, v.26, p.474-8, 2010.

YAMADA, T.; WADA, A.; ITOH, K.; IGARI, J. Serum amyloid A secretion from monocytic leukaemia cell line THP-1 and cultured human peripheral monocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.52, n.1, p.7-12, 2000.

YAN, S.D., CHEN, X.; FU, J.; CHEN, M.; ZHU, H.; ROHER, A.; SLATTERY, T.; ZHAO, L.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; MIGHELI, A.; NAWROTH, P.; STERN, D.; SCHMIDT, A. M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**, v.382, n.6593, p.685–691, 1996.

YAN, S.D.; ZHU, H.; ZHU, A.; GOLABEK, A.; DU, H.; ROHER, A.; YU, J.; SOTO, C.; SCHMIDT, A.M.; STERN, D.; KINDY, M. Receptor dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. **Nature Medicine**, v.6, p.643–651, 2000.

YAN, C.; BOYD, D.D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **Journal of Cellular Physiology**, v.211, n.1, p.19-26, 2007.

YANG L, WANG L, LIN H K, KAN P Y, XIE S, TSAI M Y, WANG P H, CHEN Y T, CHANG C. Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.305, p.462–469, 2003.

YAO Y, KUBOTA T, SATO K, TAKEUCHI H, HANDA Y, ET AL. Cell-specific but p53-independent regulation of vascular endothelial growth factor expression by interferons in human glioblastoma cells. **J Neurooncol**, v.76, p.219-25, 2006.

YU Y, LIU J, LI SQ, PENG L, YE RD. Serum amyloid a differentially activates microglia and astrocytes via the PI3K pathway. **J Alzheimers Dis**, v.8, p.133-44, 2014.

ZAGZAG D. ET AL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. **Cancer**, 88:2606-18, 2000.

ZHANG R, BANIK NL, RAY SK. Differential sensitivity of human glioblastoma LN18 (PTEN-positive) and A172 (PTEN-negative) cells to Taxol for apoptosis. **Brain Res**, v.1239, p.216-225, 2008.

ZHANG G, SUN X, LV H, YANG X, KANG X. Serum amyloid A: A new potential serum marker correlated with the stage of breast cancer. **Oncol Lett**, v.3, p.940-944, 2012.

ZHANG J, KOU YB, ZHU JS, CHEN WX, LI S. Knockdown of HMGB1 inhibits growth and invasion of gastric cancer cells through the NF- κ B pathway in vitro and *in vivo*. **Int J Oncol**, v.44, p.1268-76, 2014.

ZHAO Y, ZHOU S, HENG CK. Celecoxib inhibits serum amyloid a-induced matrix metalloproteinase-10 expression in human endothelial cells. **J Vasc Res**, v.46, p.64-72, 2009.

ZHAO Y, XIAO A, DIPIERRO CG, CARPENTER JE, ABDEL-FATTAH R, REDPATH GT, LOPES MB, HUSSAINI IM. An extensive invasive intracranial human glioblastoma xenograft model: role of high level matrix metalloproteinase 9. **Am J Pathol**, v.176, p.3032-49, 2010.

ZHOU, Y, BIAN, X, LE, Y, GONG, W.; HU, J.; ZHANG, X.; WANG, L.; IRIBARREN, P.; SALCEDO, R.; HOWARD, O.M.Z.; FARRAR, W.; WANG, J.M. Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, n.11, p.823–835, 2005.

ZHOU F, SHEN Q, CLARET FX. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. **J Leukoc Biol**, v.94, p.423-9, 2013.

ZSARNOVSZKY, A., BELCHER, S.M. Spatial, temporal, and cellular distribution of the activated extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. **Brain Res. Dev. Brain Res**, v.150, p.199–209, 2004.