

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

HELOISA TRINDADE MOREIRA

Análise celular e molecular da ação do peptídeo Ac₂₋₂₆ da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero.

Heloisa Trindade Moreira

Análise celular e molecular da ação do peptídeo Ac₂₋₂₆ da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
Coorientadora: Prof^a. Dr^a Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto
2015

Moreira, Heloisa Trindade.

Análise celular e molecular da ação do peptídeo Ac2-26 da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero / Heloisa Trindade Moreira. -- São José do Rio Preto, 2015
66 f. : il., tabs.

Orientador: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Coorientador: Sonia Maria Oliani

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Expressão gênica. 3. Colo uterino – Câncer.
4. Anexina A1. 5. Reação em cadeia de polimerase. 6. Células - Cultura e meios de cultura. I. Rodrigues-Lisoni, Flávia Cristina. II. Oliani, Sonia Maria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 575.113

HELOISA TRINDADE MOREIRA

Análise celular e molecular da ação do peptídeo Ac₂₋₂₆ da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Sonia Maria Olini

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Ilha Solteira
Orientadora

Prof. Dr^a. Cristiane Damas Gil
UNIFESP- São Paulo

Prof. Dr. Edson Guilherme Vieira
UNESP – Ilha Solteira

São José do Rio Preto
20/02/2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Luzia e Alaércio, por ser meu exemplo de honestidade e seriedade, pelo apoio absoluto para que eu alcançasse meus objetivos, por investirem e acreditarem nos meus sonhos e por todo amor desde sempre.

Muito Obrigada!

*Ao meu irmão Heitor, por ser exemplo de dedicação, seriedade e cumplicidade,
por todo apoio nos momentos difíceis e por ser essencial nesta conquista.*

Muito Obrigada!

À Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, por toda contribuição na minha formação acadêmica, por me dispor seu tempo e dedicação desde 2010, por ser tão essencial em minha trajetória de aprendizado, por toda paciência em me ensinar os primeiros passos, por toda simplicidade, por me direcionar nos meus projetos me ajudando a crescer como profissional.

*À Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani, meu agradecimento pelos seus ensinamentos
e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Mestrado concedida.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), por possibilitar a realização desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Eloiza Helena Tajara da Silva coordenadora do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica (LMMBM), da faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pela doação da linhagem celular e colaboração no desenvolvimento do projeto.

À aluna de doutorado Bianca Rodrigues da Cunha (LMMBM), pelo auxílio prestado na realização da técnica de PCR em tempo real.

À pós doutoranda, Giovana Mussi Polachini (LMMBM), pelo auxílio prestado na realização da técnica de *Western Blotting*.

Ao Prof. Dr. Alan Rodrigo Panosso pelo auxílio imenso nas análises estatísticas, muito obrigada!

Às amigas Caroline de Freitas Zanon, Kallyne Kioko Oliveira Mimura, Laila Toniol Cardin, Marina de Paula Silva e Marystela Fávero de Oliveira Cardoso com quem compartilhei expectativas, angústias e conquistas em cada etapa desse trabalho.

Aos valiosos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Alexandre Dantas Gimenes, Andréia Rodrigues de Moraes, Ana Paula Girol, Claudia Bosnich Mello, Cristiane Damas Gil, Deriane Elias Gomes, Frans Eberth Costa Andrade, Janesly Prates, Lucas Ribeiro Azevedo e Maysa Succi uma equipe a qual é exemplo de trabalho com alegria e entusiasmo.

À minha querida amiga Jéssica Zani Lacerda pelo companheirismo, ensinamentos, paciência, por compartilhar comigo momentos especiais, e por ser verdadeira e compreensiva nos momentos de dificuldade.

Ao Juan Vítor Ruiz, pelo amor e carinho, por acreditar no meu potencial, pelo apoio emocional, pela paciência e por ser essencial nos momentos mais importantes.

Aos meus queridos amigos da UNESP de Ilha Solteira Aline Aparecida dos Reis, Ana Carolina dos Santos Gomes, Mizael de Melo Ferreira, pelo companheirismo e pela amizade verdadeira e em especial Giovana Sousa Branco e Natália Cristina Antonietti, amigas queridas e dedicadas que tenho um carinho especial.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de colo de útero, também chamado de câncer cervical, é o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres mundialmente, sendo a quarta causa de morte por câncer em países em desenvolvimento. A carcinogênese de colo de útero está relacionada com alterações genéticas, infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV), angiogênese e processos inflamatórios. A anexina-A1 (ANXA1), proteína de 37 kDa, que é expressa pelas células tumorais atua como moduladora do processo inflamatório. Os dados disponíveis sugerem que essa família de proteínas pode ter, além de seu importante papel no processo inflamatório, um envolvimento significativo no câncer, por meio de cascatas de sinalização que incluem genes relacionados com o ciclo celular, a diferenciação e a apoptose. **OBJETIVOS:** Em função da importância do efeito anti-inflamatório do peptídeo Ac₂₋₂₆ nas células carcinogênicas, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar a influência desse anti-inflamatório nas células SiHa. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Utilizamos a linhagem celular SiHa (derivada das células de carcinoma epidermóide de cérvix), tratada com o peptídeo Ac₂₋₂₆ na concentração de 10µg/mL por 2, 4, 24, 48 e 72 horas. Avaliamos morfologia; proliferação e migração celular; apoptose, necrose e apoptose tardia; citocinas pró inflamatórias; expressão protéica e dos genes *COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*; nas amostras controle e tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆, pelas técnicas de microscopia de luz, Citometria de fluxo, Magipix, Western Blotting e PCR quantitativo em tempo real. **RESULTADOS:** Nas células de carcinoma de colo uterino observamos que não houve alteração na morfologia celular após o tratamento com peptídeo Ac₂₋₂₆, entretanto houve a redução da proliferação e migração celular. No ensaio de citômetro de fluxo não houve indução de apoptose, apoptose tarde ou necrose, porém no ensaio MagPix houve redução da interleucina 6 (IL-6) nas células SiHa tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆. A ação do tratamento realizado com a proteína exógena não influenciou na expressão da proteína Anexina A1 endógena, mas mostrou-se significativa na redução da expressão dos genes *COX-2*, *EP4* e *TIMP2* relacionados com processos inflamatórios e de invasão tumoral. **CONCLUSÕES:** Os nossos resultados apontam o peptídeo Ac₂₋₂₆ como um alvo potencial das atividades gênicas, sendo possível sua indicação em terapias inovadoras no tratamento de carcinomas de colo uterino.

Palavras-chave: câncer de colo de útero, cérvix, anexina A1, expressão gênica, cultura de células, PCR quantitativo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide and is the fourth leading cause of cancer deaths in developing countries. The cervical carcinogenesis is related to genetic alterations, infection by the Human Papillomavirus (HPV), angiogenesis and inflammation. Annexin-A1 (ANXA1), 37 kDa protein, which is expressed by tumor cells acts as a modulator of the inflammatory process. Evidence suggests that this protein family may have, in addition to its important role in the inflammatory process, significant involvement in cancer, through signaling cascades that include genes related to cell cycle, differentiation and apoptosis. **OBJECTIVES:** Because of the importance of the anti-inflammatory effect of Ac2-26 peptide in carcinogenic cells, this study aimed to investigate the influence of anti-inflammatory in SiHa cells. **MATERIALS AND METHODS:** SiHa cell line (derived from squamous cell carcinoma of cervix), treated with Ac2-26 peptide at a concentration of 10µg/mL for 2, 4, 24, 48 and 72 hours. We evaluate morphology; cell proliferation and migration; apoptosis, late apoptosis and necrosis; pro-inflammatory cytokines; protein expression and COX-2 genes, EP3, EP4, MMP2, MMP9, TIMP1 and TIMP2; control and the samples treated with the peptide Ac2-26, by light microscopy techniques, flow cytometry, magipix, Western blotting and quantitative PCR in real time. **RESULTS:** In cervical carcinoma cells observed that there was no change in cell morphology after treatment with peptide Ac2-26, however, there was a reduction in cell proliferation and migration. In the test flow cytometry there was no induction of apoptosis, late apoptosis or necrosis, but the test Magpix decreased interleukin 6 (IL-6) in SiHa cells treated with the peptide Ac2-26. The effect of treatment carried out with the exogenous protein did not affect the expression of Annexin A1 endogenous protein, but showed a significant reduction of the expression of COX-2 genes, TIMP2 EP4 and related inflammatory processes or tumor invasion. **CONCLUSIONS:** Our results show the peptide Ac2-26 as a potential target of gene activities, and possible indications in innovative therapies in the treatment of cervical carcinomas.

Keywords: cervical cancer, cervix, annexin A1, gene expression, cell culture, quantitative PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da proteína anexina, mostrando os aminoácidos da região N terminal e as 4 repetições de 70-80 aminoácidos na região C terminal.....**24**
- Figura 2.** Modelo de duas placas com 6 poços contendo 5×10^4 células SiHa, sem (controle) e com tratamento com ANXA1_{Ac2-26}, coletados nos cinco diferentes tempos experimentais (2, 4, 24, 48 e 72 horas).....**31**
- Figura 3.** Análise da morfologia da linhagem celular SiHa. (A) Controle e (B) tratada com peptídeo Ac₂₋₂₆ [10µg/mL]. N: núcleo; nu: nucléolo; setas: prolongamentos citoplasmáticos. Aumento de 400X.....**38**
- Figura 4.** Análise do crescimento da linhagem SiHa, controle e tratada com 10ug/mL do peptídeo Ac₂₋₂₆, nos períodos de 2, 4, 24, 48 e 72 horas. Os resultados expressam a média de amostras em triplicata.....**39**
- Figura 5.** Efeito do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} sobre a migração celular de SiHa após 0, 2, 4, 24, 48 e 72 horas de incubação.....**40**
- Figura 6.** Quantificação das células SiHa transmigradas, controle e tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆, após 0, 2, 4, 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M. do ensaio em triplicata. *** $p < 0,001$ versus controle.....**41**
- Figura 7.** Histogramas obtidos da citometria de fluxo demonstrando a viabilidade (Q4), apoptose (Q3), apoptose tardia (Q2) e necrose (Q1) de células SiHa, incubadas com meio MEM (controle) ou tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} por 72 horas, em triplicatas. A viabilidade celular foi aferida pela incubação com ANEXINA-V e/ou PI e, a intensidade de fluorescência avaliada por citometria de fluxo.....**42**

Figura 8. Efeito do tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} após 72 horas sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose de SiHa. As células SiHa foram incubadas com meio completo (MEM) (controle) ou tratadas com o peptídeo. A viabilidade celular foi aferida pela incubação com Anexina-V e/ou PI e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M de células em triplicata.....**43**

Figura 9. Efeito do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} sobre a expressão de citocinas inflamatórias. Concentração das interleucinas 1 β (IL- β), 4 (IL-4), 6 (IL-6), 8 (IL-8), TNF- α e MCP-1 em sobrenadante de cultura de células SiHa em condições controle (branco) e após o tratamento com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} (preto). Dados expressos como média $\pm$ SEM do ensaio em triplicata. *** $p < 0,001$ versus controle da concentração analisada (pg/mL).....**44**

Figura 10. Membrana de nitrocelulose, mostrando as bandas imunomarcadas (A) o anticorpo anti - ANXA1 e (B) o anticorpo anti-ACTB nas amostras de células SiHa controle (C) e SiHa tratada com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} (T) e marcador molecular (M).....**45**

Figura 11. Densitometria da membrana de nitrocelulose realizada com as bandas de 37kDa (ANXA1 total) e de 33kDa (ANXA1 clivada) em relação às bandas do anticorpo do ACTB para as amostras de células SiHa controle e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}.....**45**

Figura 12. Análise da expressão dos genes COX2, EP3, EP4, MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2, por PCR em tempo real. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 *versus* controle.....**46**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema do experimento realizado, em dias, em duas placas de cultura de 6 poços com duas condições experimentais diferentes (controle e tratadas com ANXA1 _{Ac2-26}).....	31
Tabela 2. Iniciadores para os genes de interesse.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL: microlitros

%: porcentagem

>: maior

≤: menor ou igual

°C: graus célsius

μg: microgramas

μM: micromolar

ACTB: β-actina

ANXA1: Proteína Anexina A1

ANXA1 Ac2-26: peptídeo da porção N-terminal da proteína *ANXA1*

ANOVA: Análise de variância

AP-1: Fator de transcrição

CCL2: Quimiocina (ligante 2)

CCL5: Quimiocina (ligante 5)

CXCL8: Quimiocina (ligante 8)

CXCL12: Quimiocina (ligante 12)

cDNA: DNA complementar

cm²: centímetros quadrados

cm³: centímetros cúbicos

CO₂: gás carbônico

COX: ciclo oxigenase -2

Ct: Cycle threshold

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGFR: Receptor do fator de crescimento epitelial

EP3: receptor de prostaglandina E 3 (subtipo EP3)

EP4: receptor de prostaglandina E 4 (subtipo EP4)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HIF: Fator de transcrição de proteínas

HPV: Papilomavirus Humano

HeLa: Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de cérvix (adenocarcinoma)

I- κ B (IKK): kinase I κ B, complexo enzimático, envolvido na resposta celular à inflamação

IBILCE: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

IFN γ : Interferon gama

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 17

IL-23: Interleucina 23

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kDa: kilodalton

Log2: escala logarítmica de base 2

mA: miliampère

MCP-1: Proteína quimioatrativa de monócitos

Meio MEM (Earle): mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e compostos essenciais para crescimento celular

mg: miligrama

MIF: Fator inibidor de migração de macrófagos

MMP2: Matriz metaloroteinase 2

MMP9: Matriz metaloroteinase 9

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

NF- κ B: Fator de crescimento nuclear kappa B

ng: nanograma

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGE2: Prostaglandina E receptor 2

PI: Iodeto de propídio

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: rotação por minuto

RT: transcriptase reversa

SiHa: linhagem celular derivada de células de carcinoma epidermóide de cérvix

STAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TGF- β : Fator de transformação do crescimento

TIMP1: Inibidor de tecido de metaloproteinase 1

TIMP2: Inibidor de tecido de metaloproteinase 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral (alfa)

TRIzol: solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina

U: unidades

UNESP: Universidade Estadual Paulista

V: volts

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

Δ : delta

Sumário

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>17</u>
<u>2. OBJETIVOS</u>	<u>26</u>
<u>3. MATERIAL E METÓDOS</u>	<u>28</u>
3.1 CULTIVO DA LINHAGEM CELULAR SiHA	29
3.2 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	29
3.3 ANÁLISES DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO E MORFOLOGIA CELULAR	30
3.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	31
3.5 CITOMETRIA DE FLUXO	32
3.6 ENSAIOS MULTIPLEX PARA ANÁLISE DE CITOCINAS/QUIMOCINAS.....	32
3.7 <i>WESTERN BLOTTING</i>	33
3.8 SELEÇÃO DE GENES DE INTERESSE.....	34
3.9 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	35
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
<u>4 RESULTADOS</u>	<u>37</u>
4.1 MORFOLOGIA CELULAR.....	38
4.2 ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	38
4.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	39
4.4 CITOMETRIA DE FLUXO	41
4.5 ENSAIO MULTIPLEX: DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS SiHA APÓS TRATAMENTO COM ANXA1 _{Ac2-26}	44
4.6 <i>WESTERN BLOTTING</i>	44
4.7 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	46
<u>5 DISCUSSÃO</u>	<u>47</u>
<u>6 CONCLUSÕES</u>	<u>54</u>
<u>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>56</u>

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é uma das principais neoplasias ginecológicas em todo o mundo, é uma doença do colo do útero que está associada ao papilomavírus humano (HPV) e/ou a infecção com os agentes bacterianos, tais como *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorréia*. É considerado o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado e a quarta causa de morte por câncer em mulheres (DUENAS-GONZALES et al., 2014), a avaliação da extensão dessa doença é essencial para o planejamento do tratamento ideal (ALCÁZAR et al., 2014). A cada ano surge cerca de 530 mil novos casos, com aproximadamente 275 mil mortes por ano (ADEFUYE; SALES, 2012; JEMAL et al., 2011). Mulheres do sul e leste da África, América Central e América do Sul possuem grande risco de desenvolver câncer cervical, com uma incidência média anual de 40 casos por 100.000 mulheres (FRANCO et al., 2003). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontaram para aproximadamente 15.590 novos casos para 2014 fazendo 5.160 vítimas fatais por ano.

Aproximadamente 35% das mulheres diagnosticadas com carcinoma cervical tem a doença recorrente, com 90% desses achados dentre 3 anos depois do tratamento inicial (PECTASIDES et al., 2008). Assim, terapias alvo e estratégias de quimio-radiosensibilização são essenciais para a redução da mortalidade desta malignidade.

Muitas alterações genéticas e epigenéticas ocorrem durante a tumorigênese cervical. Entre essas alterações, metilação da região promotora de genes supressores de tumor, favorecem o seu silenciamento e resultando na oncogênese do carcinoma cervical (ZHANG et al., 2011). Outro fator relacionado diretamente ao carcinoma de colo de útero é a infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV), o HPV16 é responsável por 50-70% dos casos de câncer do colo do útero em todo o mundo (FREITAS et al., 2014).

Mais de 5 milhões de mulheres desenvolvem câncer cervical todos os anos, esse tipo de câncer é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, particularmente nos países em desenvolvimento. O câncer cervical é único entre as neoplasias ginecológicas por apresentar um agente causador, o HPV (RAMEZ; KRISHNANSU, 2015). Em mais de 95% dos casos, ele é associado com esse vírus, que é persistente, particularmente em pessoas com um sistema imunitário deficiente. Embora possa ser prevenida, a

simples magnitude de prevalência de HPV na população mundial torna um perigo dominante de saúde atual.

A descoberta da associação etiológica entre HPV e câncer cervical no século passado direcionou a renovação de vários métodos de rastreio do câncer de colo uterino, e a mortalidade por esse tipo de câncer foi significativamente reduzida em alguns países desenvolvidos após o início do método de rastreio organizado, chamado exame de Papanicolau (SHAO-MING; YOU-LIN, 2015). Apesar da infecção do HPV ser o principal fator de risco relacionado a esta doença, há outros fatores que contribuem com o desenvolvimento do carcinoma de colo de útero, entre eles a idade, número de parceiros sexuais, o qual tem sido relacionado com co-infecções, fumo, uso prolongado de contraceptivos hormonais e um grande número de gravidez (PARADKAR et al., 2014; SOTO-DE LEON et al., 2011).

Uma característica comum neste tipo de tumor é a expressão elevada de dois oncogenes, chamados *E6* e *E7*, que codificam proteínas multifuncionais conhecidas por sua habilidade de inativar os supressores tumorais, p53 e pRb, respectivamente (NARISAWA-SAITO; KIYOTO, 2007). Essa expressão alterada dos oncogenes leva às instabilidades no genoma por bloqueio do ciclo celular e desregulação dos checkpoints nessas células devido a perda dos supressores tumorais p53 e pRb, progredindo então o processo tumorigênico (INCASSATI et al., 2006). Em linhagens de tumores cervicais, SiHa e HeLa, foi observado que o silenciamento do gene *MLL5 β* , uma isoforma do gene *MLL5*, ocasionou a baixa regulação das oncoproteínas E6 e E7 resultando na restauração dos níveis da proteína p53 e reduzindo a fosforilação da pRb (YEW et al., 2011).

O hormônio estrógeno também é um dos fatores relacionados com este tipo de câncer, podendo promover ou suprimir o desenvolvimento neoplásico. O colo uterino é altamente sensível ao estrógeno e, durante o ciclo menstrual, as células epiteliais cervicais proliferam e se diferenciam à medida que os níveis desse hormônio aumentam, resultando em epitélio hiperplásico sem mudanças patológicas. O estrógeno não apenas contribui para a gênese como também para a manutenção da doença cervical neoplásica (CHUNG et al., 2010).

A carcinogênese de colo de útero está relacionada com processos angiogênicos e inflamatórios e o papel das células inflamatórias, que são características do microambiente tumoral, na progressão neoplásica, tem sido foco de muita discussão (ZIJLMANS et al., 2009). A ideia de que a inflamação está envolvida na tumorigênese é baseada no fato do câncer surgir frequentemente em áreas de inflamação crônica. Os exemplos incluem a associação da pancreatite crônica e da colite ulcerativa com câncer de pâncreas e de cólon, respectivamente (CLEVERS, 2004; FARROW et al., 2004).

A angiogênese é promovida pelos tumores que secretam fator de crescimento endotelial vascular do subtipo A (VEGF-A), fator básico de crescimento fibroblasto (bFGF) (SALGADO et al., 2004) e fator de crescimento de transformação (TGF)- β 1. A presença de infiltrado inflamatório também é de suma importância no processo de neovascularização; os tumores recrutam células de origem hematopoiética, em especial os macrófagos, que compõem a massa tumoral e parecem estar diretamente envolvidos na progressão e metástase (CONDEELIS; POLLARD, 2006).

No início do processo neoplásico, as células inflamatórias e os fatores sintetizados por elas regulam o crescimento, a migração e a diferenciação de todos os tipos celulares no microambiente tumoral incluindo as células neoplásicas, as endoteliais e os fibroblastos. É possível que, posteriormente, as células neoplásicas utilizem alguns mecanismos inflamatórios para invasão de outros tecidos, como migração ou diapedese por entre as células endoteliais e adesão de células à parede de vasos. Perretti, em 1997, já havia destacado a semelhança da metastização com esses estágios da inflamação.

As células inflamatórias secretam inúmeras citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que estimulam a proliferação, inibem a apoptose, induzem a morfogênese e geram espécies reativas de oxigênio capazes de degradar o DNA (COUSSENS; WERB, 2002). Consequentemente, promovem um ambiente propício para o processo neoplásico, facilitando a instabilidade genômica (RONNOV-JESSEN; PETERSEN; BISSELL, 1996; TLSTY; HEIN, 2001). Além disso, o VEGF, a angiopoetina e as metaloproteinases estão entre os fatores produzidos pelas células inflamatórias presentes no tumor, estimulando a mitose de células endoteliais vasculares e o remodelamento da

matriz extracelular que contribuem para a angiogênese (CARMELIET; JAIN, 2000).

Com essas considerações, fica evidente que um grande número de padrões de sinalização devem participar das interações entre células inflamatórias e tumorais. Um exemplo é o padrão de sinalização do NF- κ B, um fator de transcrição cuja ativação é dependente da quinase I κ B (IKK) e ocorre em resposta a citocinas pró-inflamatórias e infecções virais e microbianas. O NF- κ B, que está relacionado com a transcrição de genes cujos produtos inibem a apoptose, foi detectado ativado ou com expressão elevada em muitas neoplasias. Recentemente, foi reconhecido seu papel em tumores precedidos por inflamação crônica, que mostraram tamanho significativamente reduzido após inativação específica de IKK/NF- κ B em células mielóides, provavelmente devido a redução da expressão das citocinas pró-inflamatórias (GRETEN et al., 2004).

Dentre as citocinas, as que parecem desempenhar papéis importantes no comportamento de vários tipos celulares dentro de um tumor, encontramos TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8. Além desses mediadores, proteínas relacionadas com o processo tumorigênico, como MCP-1, TGF- β e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), também podem atuar nesse contexto (AGGARWAL; GEHLOT, 2009; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; SANSONE; BROMBERG, 2011). A maioria desses fatores é produzida pelas células tumorais e inflamatórias, promovendo a comunicação parácrina e autócrina no microambiente tumoral, podendo influenciar todos os estágios do desenvolvimento tumoral, incluindo a iniciação, promoção, progressão e metástase (AGGARWAL et al., 2009; GRIVENNIKOV; KARIN, 2011; NEURATH; FINOTTO, 2011).

A ciclo-oxigenase 2 (COX-2), enzima responsável pela síntese de mediadores inflamatórios a partir do ácido araquidônico, entre eles a prostaglandina E2 (PGE2), é super expressa em muitos tipos de carcinoma, como por exemplo o carcinoma de mama, de pulmão, de pâncreas, de cabeça e de pescoço (FEDERICO et al., 2007). A PGE2 pode ativar receptores acoplados à proteína G, tais como EP1, EP2, EP3 e EP4 e regula a expressão, secreção e ativação de várias metaloproteinases em diferentes tipos celulares.

Alguns dados da literatura sugerem que a expressão de EP3 possui papel prognóstico no câncer (ABRAHAO et al., 2010).

As proteínas que naturalmente inibem a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) são as codificadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A proteólise descontrolada das MMPs promove degradação da matriz extracelular, invasão de células tumorais e aumento do risco de metástase de células cancerígenas (BOURBOULIA et al., 2013). Estudos realizados por Guedez e colaboradores (2012) mostram que tumores de pulmão deficientes em TIMP-2 desencadearam a ativação de metaloproteinases de matriz (MMP) que pode mediar a liberação de fatores inflamatórios, aumento adicional da angiogênese e imunossupressão. O modelo proposto por Lee e colaboradores (2012) relata que os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a PGE2 promove a invasão de células epiteliais e estromais do endométrio na matriz extracelular, são a ligação da prostaglandina aos receptores EPs e fosforilação e ativação de β -arrestina, e de MMPs.

Diferentes citocinas podem promover ou inibir o desenvolvimento e a progressão tumoral, independentemente da sua origem (LIN; KARIN, 2007). Por meio da ativação de vários fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1 e STAT3, as citocinas e quimiocinas controlam o microambiente inflamatório, favorecendo a imunidade anti-tumoral (IL-12, IFN- γ) ou a progressão do tumor (TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23, MCP-1, ligantes EGFR, TGF- β) (AGGARWAL; GEHLOT, 2009; GRIVENNIKOV et al., 2010).

O TNF- α pode induzir a produção de inúmeras quimiocinas e citocinas (CXCL12, CCL2, IL-6, MIF) e do fator de crescimento VEGF, promovendo a angiogênese e capacidade metastática dos tumores (GRIVENNIKOV; KARIN, 2011; NEURATH; FINOTTO, 2011). A quimiocina IL-8 pode auxiliar no crescimento e na metástase em alguns tumores, como no melanoma humano, câncer de ovário, bexiga, pulmão e estômago (AGGARWAL et al., 2006; FEDERICO et al., 2007).

A IL-6 é produzida pelas células tumorais, inflamatórias e estromais, e contribui na tumorigênese por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo angiogênese, sobrevivência e metástase (GRIVENNIKOV; KARIN, 2011; NEURATH; FINOTTO, 2011). A sinalização da IL-6 leva ao aumento da

produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, proteases e fatores de crescimento (IL-6, IL-1 β , IL-23, CCL5, CXCL8, MCP-1, MMP9, MMP2, VEGF e HIF) (AGGARWAL; GEHLOT, 2009; SANSONE; BROMBERG, 2011). Usando ferramentas genéticas, pesquisadores demonstraram que a IL-6 promove a proliferação e sobrevivência das células epiteliais intestinais, promovendo a iniciação e progressão do câncer associado à colite (CAC) (BOLLRATH et al., 2009; GRIVENNIKOV; KARIN et al., 2011; PORTA et al., 2009).

Por outro lado, a resposta inflamatória é controlada pela ação de mediadores anti-inflamatórios, que atuam para manter a homeostasia da resposta imunológica e prevenir a lesão tecidual. Entre esses mediadores destacamos a anexina-A1 (ANXA1), proteína de 37 kDa, que é expressa pelas células tumorais e atua como moduladora do processo inflamatório (SILISTINO-SOUZA et al., 2007; ALVES et al., 2008).

A ANXA1 foi o primeiro membro caracterizado de uma superfamília de proteínas que se ligam aos fosfolipídios de uma forma dependente de cálcio (RESCHER; GERKE, 2004). Essa proteína foi inicialmente denominada lipocortina pelo fato de mimetizar a ação anti-inflamatória dos glicocorticóides por meio da inibição da síntese de eicosanóides e fosfolipase A₂ (PLA₂), afetando dessa forma componentes da reação inflamatória e liberação do ácido araquidônico (FLOWER, 1988; PERRETTI; GAVINS, 2003).

Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios: uma pequena região N-terminal, variando em comprimento e composição, e um domínio central, região C-terminal, formado por quatro a oito dobras repetidas de uma sequência conservada de 70 a 80 aminoácidos (RESCHER; GERKE, 2004). O domínio N-terminal é específico para cada membro dessa família e interage com os diferentes ligantes dessas proteínas, enquanto a região C-terminal é responsável pela afinidade ao cálcio e consequente ligação aos fosfolipídios.



Figura 1. Esquema da proteína anexina, mostrando os aminoácidos da região N terminal e as 4 repetições de 70-80 aminoácidos na região C terminal (RODRIGUES-LISONI; HENRIQUE; TAJARA, 2011).

A ANXA1 pode ser especialmente encontrada em diversos tipos celulares relacionados aos processos de defesa como neutrófilos (OLIANI et al., 2001), mastócitos (OLIANI et al., 2008), eosinófilos (OLIANI; DAMAZO; PERRETI, 2002) e monócitos (GOULDING et al., 1990). Essa proteína é particularmente abundante em leucócitos polimorfonucleares, nos quais pode representar cerca de 4% do total de proteínas citosólicas (ERNST et al., 1990).

A expressão e localização da ANXA1 têm sido investigadas no nosso laboratório em modelos experimentais de inflamação aguda induzida por carragenina no mesentério de ratos, por meio da análise dos leucócitos extravasados e endotélio vascular (OLIANI et al., 2001; GIL et al., 2006), e de inflamação crônica granulomatosa na pele de camundongos (GIBBS et al., 2002; OLIANI et al., 2008). Ainda, após a descoberta por Cirino e colaboradores (1993) de que a atividade biológica da ANXA1 poderia ser reproduzida pelos primeiros vinte e seis aminoácidos da porção N-terminal da proteína ou por alguns peptídeos menores (PERRETTI et al., 2001), tornou-se uma prática comum o uso dessas moléculas em modelos experimentais de inflamação aguda (DAMAZO et al., 2006; GAVINS et al., 2007), crônica (GIBBS et al., 2002) e sistêmica (DAMAZO et al., 2005). A administração desses peptídeos miméticos da ANXA1 leva a ativação dos seus receptores, que são mais abundantes em leucócitos aderentes, e promove a ativação celular e a sinalização intracelular, com o destacamento dos leucócitos do endotélio (GAVINS et al., 2003; GASTARDELO et al., 2009).

A expressão da ANXA1 na carcinogênese cervical tem sido pouco investigada. Um dos artigos publicados mostrou diminuição nos níveis dessa proteína e do seu RNAm em neoplasia intraepitelial cervical, concluindo que a ANXA1 pode ser considerada um marcador biológico na detecção da

progressão do câncer cervical invasivo (LEE; CHUNG; MOON., 2008). Além disso, o estudo de Shen e colaboradores (2010) detectou a baixa expressão da ANXA1 em células SiHa, linhagem celular derivada de tumor cervical, tratadas com complexo citrato lantanun sugerindo um papel dessa proteína na via de apoptose regulando os fatores de crescimento relacionados. Outro estudo, também utilizando a linhagem celular SiHa, isolou e caracterizou uma subpopulação altamente tumorigênica, a qual exibiu características de células iniciadoras de câncer (CICs), e resistência a radiação em tumores sólidos (LOPEZ et al., 2012). Assim, pensando em novas estratégias de tratamento, a administração da ANXA1 nas células carcinogênicas pode ser uma alternativa.

Desse modo, os trabalhos relacionados com a ANXA1 têm contribuído para um maior entendimento do papel desta proteína no processo inflamatório e tumorigênico. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a ANXA1 modula as respostas celulares nos processos inflamatórios ainda não estão completamente determinados. Os dados disponíveis sugerem que essa família de proteínas pode ter, além de seu importante papel no processo inflamatório, um envolvimento significativo no câncer, através de cascatas de sinalização que incluem genes relacionados com o ciclo celular, diferenciação e apoptose. Diante dessas considerações, investigamos, *in vitro*, a ação da proteína anti-inflamatória ANXA1 sobre as células tumorais SiHa, avaliando a morfologia, proliferação e migração celular, assim como o padrão de citocinas/quimiocinas e a expressão protéica e dos genes COX-2, EP3, EP4, MMP2 e MMP9, TIMP1 e TIMP2 de modo a determinar como a ANXA1 atua na expressão desses genes e como essas alterações podem participar do processo tumorigênico.

2. OBJETIVOS

Em função da importância do efeito anti-inflamatório do peptídeo Ac₂₋₂₆ nas células carcinogênicas, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar a influência desse anti-inflamatório nas células SiHa, ajudando a determinar como este peptídeo atua no processo tumorigênico.

Os seus objetivos específicos compreenderam:

Nas células tumorais SiHa tratadas *in vitro* com peptídeo Ac₂₋₂₆ avaliamos:

1. A morfologia, índice de proliferação e migração celular
2. Viabilidade celular analisando: apoptose, apoptose tardia e necrose;
3. Os padrões de citocinas/quimiocinas nos sobrenadantes da cultura celular para interleucinas 1 β (IL- β), 4 (IL-4), 6 (IL-6), 8 (IL-8) e TNF- α e MCP-1.
4. A expressão da proteína endógena ANXA1
5. A expressão dos genes *COX 2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2* e *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo da linhagem celular SiHa

A linhagem celular SiHa, células de carcinoma epidermóide de cérvix, (ATCC®–HTB-35™- American Type Culture Collection), constitui uma linhagem celular que reúne as melhores condições técnicas para o desenvolvimento desse trabalho. Essas células foram cultivadas em meio completo MEM-Earle (Cultilab, Br), pH 7,5 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Br), 1% de aminoácidos não essenciais 10mM (*Invitrogen, Carlsbad, USA, UK*) e 1% de antibiótico/antimicótico (*Invitrogen, Carlsbad, USA, UK*) e semeadas em garrafas de cultura de 75 cm², na concentração de 10⁶ células e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, até se fixarem na garrafa de cultura. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou até as células se tornarem confluentes. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* e, quando a densidade celular atingiu confluência de 80-90%, o material foi submetido à desagregação celular por meio de tripsina e subdividido em duas réplicas. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE-UNESP, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Olini, no Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Departamento de Biologia Molecular – FAMERP- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto em colaboração com a Prof^a Dr^a Eloiza Helena Tajara da Silva e no Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS-UNESP sob a orientação da Prof^a Dr^a Flávia Cristina Rodrigues Lisoni.

3.2 Tratamento Farmacológico

As células SiHa foram tratadas em meio completo como descrito anteriormente e, posteriormente, subdivididas nos seguintes grupos:

- Controle: apenas meio completo;
- ANXA1: tratada com o peptídeo N-terminal Ac2-26 da ANXA1 (Ac-MVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK) (RAYNAL; POLLARD, 1994), na concentração 10µg/mL em cinco diferentes tempos (2, 4, 24, 48 e 72 horas). A

concentração e os intervalos de tempo de tratamento foram estabelecidos de acordo com testes prévios realizados por Prates (2014).

3.3 Análises do índice de proliferação e morfologia celular

Para análise do índice de proliferação celular, nas células SiHa, foi realizada a contagem de células cultivadas em placas de cultura de 6 poços, semeadas na concentração de 5×10^4 em 2mL de meio MEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem na placa de cultura. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro (MEM 0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas foi trocado o meio de cultura pelo meio completo e adicionado peptídeo Ac₂₋₂₆ em um conjunto de poços. As células receberam a concentração de 10µg/mL desse peptídeo para cinco diferentes tempos de contagem celular (2, 4, 24, 48 e 72 horas), as células das outras placas que não receberam o peptídeo continuaram nos seus respectivos poços para contagens futuras, apenas para uma comparação entre os diferentes tratamentos (controle e tratadas com o peptídeo) nos diferentes tempos. As células, tratadas ou não com o peptídeo em todos os períodos experimentais, foram tripsinizadas, coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro), como esquematizado na Tabela 1 e representado na Figura 2. Esse experimento foi realizado em triplicatas. A morfologia celular foi avaliada no microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41*, do Laboratório de Imunomorfologia. Esses ensaios foram realizados para determinar o período experimental, com a diferença estatística mais expressiva, entre os grupos tratados ou não com 10ug/mL do peptídeo, para realização dos experimentos posteriores.

Tabela 1. Esquema do experimento realizado, em dias, em duas placas de cultura de 6 poços com duas condições experimentais diferentes (controle e tratadas com peptídeo Ac₂₋₂₆).

Experimento (Dias)	Placa Controle (6 poços)	Placa ANXA1 (6 poços)
1	5 x 10 ⁴ células	5 x 10 ⁴ células
2	retirar o meio completo adicionar meio sem soro	retirar o meio completo adicionar meio sem soro
3	retirar meio sem soro adicionar meio completo	retirar meio sem soro adicionar meio completo com Ac2-26
após 2 horas	contar as céls de 1 poço	contar as céls de 1 poço
após 4 horas	contar as céls de 1 poço	contar as céls de 1 poço
5 (24h)	contar as céls de 1 poço	contar as céls de 1 poço
6 (48h)	contar as céls de 1 poço	contar as céls de 1 poço
7 (72h)	contar as céls de 1 poço	contar as céls de 1 poço

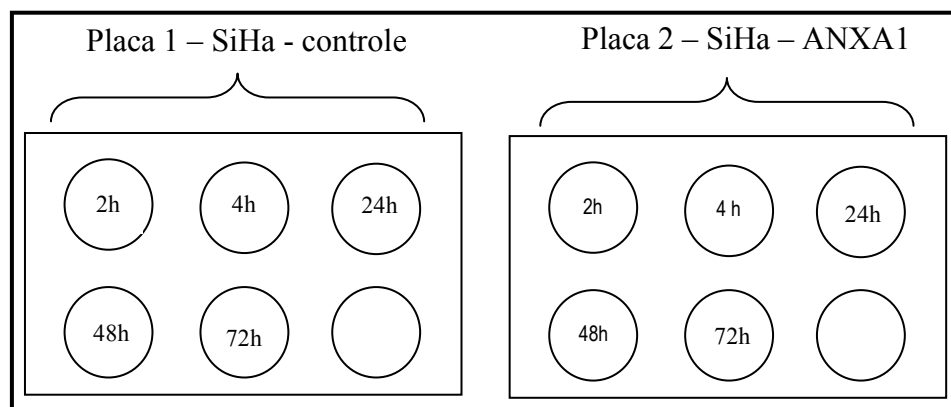


Figura 2. Modelo de duas placas com 6 poços contendo 5 x 10⁴ células SiHa, sem (controle) e com tratamento com peptídeo Ac₂₋₂₆, coletados nos cinco diferentes tempos experimentais (2, 4, 24, 48 e 72 horas).

3.4 Ensaio de Migração Celular

As células SiHa foram distribuídas em uma placa de 6 poços, e após a aderência à placa de cultura e alcance de confluência, foi realizado um “risco ou ferida” no centro dos poços com uma pipeta de 200 µl. Posteriormente, as células foram lavadas suavemente com PBS 1X e incubadas, 3 poços apenas

com o meio completo (controle) e 3 poços contendo o peptídeo Ac₂₋₂₆, na concentração de 10µg/mL durante o período de 0, 2, 4, 24, 48 e 72h. A migração celular foi monitorada com imagens obtidas antes e após o tratamento, usando uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio. Os números de núcleos celulares, que atravessaram o risco, foram determinados em quatro campos microscópicos diferentes e, posteriormente quantificados. A análise quantitativa da área de fechamento da ranhura foi analisada utilizando o programa Axiovision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

3.5 Citometria de Fluxo

As células SiHa controle e tratadas com peptídeo Ac₂₋₂₆ na concentração de 10µg/mL, foram cultivadas em triplicata nas garrafas de cultura com 75 cm³ por 72 horas. Posteriormente foram submetidas a lavagem com PBS, tripsinizadas e centrifugadas para obtenção do “pellet” de células; o “pellet” foi ressuspensionado com tampão de ligação 1X a uma concentração de 1X10⁶ cél/mL. Desta solução, foram transferidos 100µL de cada amostra para um tubo de 1,5 mL juntamente com 5µL de FITC Annexin V e 5µL de PI (*BD Pharmigen, San Diego, USA*). Após homogeneizada, a solução foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. Para a leitura foram adicionados 400µL de tampão de ligação 1X e posteriormente adquiridos 10.000 eventos de cada amostra no citômetro (*Guava Easy Cyte, MILLIPORE*).

3.6 Ensaios Multiplex para análise de citocinas/quimocinas

A fim de quantificar as citocinas dos sobrenadantes das células SiHa submetidas às condições experimentais descritas acima, utilizamos o kit *MILLIPLEX MAP HCYTOMAG 60K* e o equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (*Millipore Corporation, Billerica, MA, USA*) para a detecção multiplex quantitativa de múltiplos analitos, com rapidez e especificidade, por meio de *beads* magnéticas.

As células SiHa controle e tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆ na concentração de 10 µg/ml foram cultivadas em meio completo MEM-Earle (Cultilab, Br), pH 7,5 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Br),

1% de aminoácidos não essenciais 10mM (*Invitrogen, Carlsbad, USA, UK*) e 1% de antibiótico/antimicótico (*Invitrogen, Carlsbad, USA, UK*) e semeadas em garrafas de cultura de 75 cm², na concentração de 10⁶ células e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas. O sobrenadante das células foi cuidadosamente retirado, centrifugado, aliquoteado e mantido a -20°C até o momento do uso. As *beads* magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados e homogeneizados conforme as instruções descritas no kit (*HCYTOMAG-60K, Milliplex MAP Kit, Millipore*). Inicialmente, foram adicionados 25 µL dos padrões, soluções controles e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada previamente com o tampão de lavagem. Em seguida, 25 µL de *assay buffer* foi adicionado às amostras, 25 µL do soro matriz aos padrões e, 25 µL de *beads* magnéticas revestidas com anticorpos específicos (*HCYTOMAG-60K, Milliplex MAP Kit, Millipore*) à todos os poços (controles, padrões e amostras). A placa foi selada com selante próprio, revestida com papel alumínio e incubada *overnight* a 4°C, sob agitação no *shaker*. No dia seguinte, a placa foi lavada duas vezes com 200 µL de tampão de lavagem e incubada com 25 µL de anticorpo de detecção ligado a biotina à temperatura ambiente, por uma hora, no *shaker*. Para completar a reação, 25 µL de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada e incubada por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. A placa foi então lavada duas vezes e incubada com 150 µL do fluido (*Drive Fluid*) por cinco minutos à temperatura ambiente, no *shaker*. Em seguida, a leitura da placa foi realizada pelo *LUMINEX xMAP MAGPIX*.

A concentração dos analitos foi determinada pelo software *MAGPIX xPONENT* (*Millipore Corporation, Billerica, MA, USA*). Os ensaios foram realizados em triplicatas para confirmar os resultados. Os analitos estudados foram: Interleucina 1 beta (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), proteína quimiotática para monócitos (MCP-1).

3.7 Western Blotting

As células SiHa foram submetidas às condições experimentais (controle e tratadas com peptídeo Ac₂₋₂₆ na concentração de 10µg/mL, em garrafa de

cultura com 75 cm³ por 72 horas (tempo de maior diferença estatística significativa observado na proliferação celular) para a realização da técnica de *Western blotting*. As células foram lavadas com PBS gelado, tripsinizadas, e transferidas para um tubo falcon de 15mL. Posteriormente, foram centrifugadas, para isolamento do pellet, que foi armazenado em freezer -80°C. Para o início da técnica de *western blotting* foi acrescentado às células o tampão de extração e estas foram sonicadas (*Sonicador Fisher Scientific Model 100*) duas vezes com intervalo de dez segundos. Para a quantificação foi utilizado o *BCA Protein Assay Kit* da *Thermo Scientific*. As células foram quantificadas no leitor de placa e a leitura feita em 562nm de absorbância. A corrida foi feita em gel de poliacrilamida inicialmente com 140V e 400mA por 1 hora e finalizada com 600V e 325mA por 70 minutos. Após a separação da proteína no gel de poliacrilamida, foi realizada a corrida de transferência da proteína do gel para a membrana de PVDF *Membrana Imobilon-P* da *Millipore* (325mA por 70 minutos). Finalizada a transferência, a membrana foi submetida à etapa de imunodeteção utilizando o *“Western Breeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit”* da *Invitrogen*. Por fim, a membrana, depois de seca, foi scaneada e para realização da análise densitométrica.

3.8 Seleção de genes de interesse

Os genes estudados nesse projeto foram previamente selecionados a partir dos marcadores potenciais em ambiente tumoral identificados por estudos anteriores (RODRIGUES-LISONI et al., 2010; LEE et al., 2011), utilizando bibliotecas SAGE. As vias metabólicas desses marcadores potenciais foram avaliadas e alguns genes relacionados a elas também foram escolhidos. A seleção dos genes seguiu o seguinte parâmetro: envolvimento potencial em processos de inflamação e invasão tumoral.

Os iniciadores específicos para cada transcrito foram desenhados com a ferramenta *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>), conforme apresentado abaixo na tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores para os genes de interesse

Oligonucleotideo	Sequência
EP3 anti-sense	5' TCTCCGTGTGTGTCTTGCAG 3'
EP3 sense	5' AGCTTATGGGGATCATGTGC 3'
EP4 anti-sense	5' CCAAACCTGGCTGATATAACTGG 3'
EP4 sense	5' CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC 3'
MMP2 anti-sense	5' CCGTCAAAGGGGTATCCATC 3'
MMP2 sense	5' AAGTCTGGAGCGATGTGACC 3'
MMP9 anti-sense	5' ATTCGACTCTCCACGCATC 3'
MMP9 sense	5' TTGTGCTCTTCCCTGGAGAC 3'
COX2 anti-sense	5' AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG 3'
COX2 sense	5' ATTCCCTTCCTTCGAAATGC 3'
TIMP1 anti-sense	5' TTTTCAGAGCCTTGGAGGAG 3'
TIMP1 sense	5' ACTGTTGGCTGTGAGGAATG 3'
TIMP2 anti-sense	5' CTATATCCTTCTCAGGCCCTTTG 3'
TIMP2 sense	5' AGAAGGAAGTGGACTCTGGAAAC 3'

3.9 PCR quantitativo em tempo real

As reações foram realizadas em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), no Laboratório de Biomarcadores e Bioinformática Médica, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, SP. Todas as reações foram preparadas em triplicata, incluindo o controle endógeno, o *GAPDH* foi considerado como melhor gene normalizador para controle endógeno entre os dois testados (*GADPH* e *ACTB*), e processadas em volume final de 20µL contendo 100 a 500ng de cDNA, SYBR® Green PCR Master Mix e 100nM de cada primer, segundo protocolo da Applied Biosystems.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação de 2 min a 50°C, seguida por desnaturação inicial de 10 min a 95°C. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, para anelamento de primers e extensão das cadeias, e 35 seg a 65°C, para coleta do sinal. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 seg a 95°C seguido de 1 min a 60°C. A quantificação foi realizada comparando-se os valores de expressão obtidos das curvas padrões,

as quais foram desenhadas pela diluição seriada a partir de um *pool* de amostras de cDNA. O fator de normalização utilizado foi a média geométrica do gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), utilizado como controle interno (controle endógeno). Finalmente, os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram quantificados tendo como base a amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras.

3.10 Análises Estatísticas

A análise dos resultados da PCR quantitativa em tempo real foi a partir dos valores do Ct (Cycle threshold)* de cada amostra, sendo que foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o ΔCt a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle interno. Para o cálculo do $\Delta-\Delta Ct$, foi escolhida a amostra controle como calibrador, sendo atribuído ao mesmo o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio ΔCt . Nas demais amostras (tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}), o resultado do $\Delta-\Delta Ct$ foi calculado a partir das diferenças dos valores de ΔCt de cada um deles em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o $2^{-\Delta-\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001). Finalmente, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 2 (Log2). Foi considerado aumento ou redução significativa de expressão quando o valor de expressão foi duas vezes maior ou menor, respectivamente, em relação à amostra controle ou quando esteve acima ou abaixo de 1 quando apresentado na forma de Log2.

Para os outros ensaios, os resultados foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as amostras com distribuição normal e não repetidas foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Para amostras com distribuição não normal foi usado o teste de Mann Whitney. O nível de significância estabelecido foi de 5 %.

4.1 Morfologia Celular

Inicialmente, as células SiHa, foram cultivadas e observadas na microscopia de contraste de fase. Essas células apresentam aspecto fusiforme e núcleo de posição central, eucromático e com vários nucléolos, caracterizando uma célula de alta atividade metabólica (Figura 3A). Nas células tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆ (10µg/mL), não houve alteração morfológica, e os prolongamentos citoplasmáticos foram observados com maior nitidez devido à menor proliferação celular (Figura 3B).

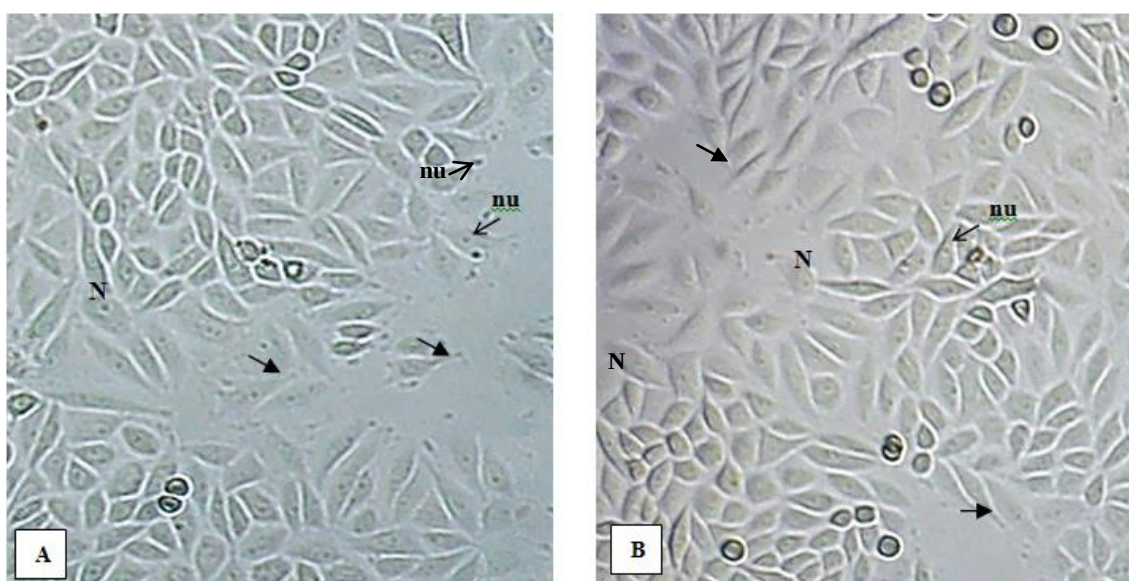


Figura 3. Análise da morfologia da linhagem celular SiHa. (A) Controle e (B) tratada com peptídeo Ac₂₋₂₆ [10µg/mL]. N: núcleo; nu: nucléolo; setas: prolongamentos citoplasmáticos. Aumento de 400X.

4.2 Índice de Proliferação Celular

Comparamos a proliferação das células SiHa tratadas ou não com o peptídeo Ac₂₋₂₆ nos diferentes tempos (2, 4, 24, 48 e 72 horas). Realizou-se uma análise do crescimento na concentração de 10µg/mL do peptídeo, a qual se mostrou significativa estatisticamente (Figura 4). O tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ reduziu progressivamente a viabilidade celular nos tempos de 4, 24, 48 e 72 horas, em relação ao controle, conforme mostra Figura 4.

Pode-se concluir, a partir do ensaio de proliferação celular e da análise estatística, que o tempo de 72 horas foi o mais significativo estatisticamente, considerando valor * $P \leq 0,05$.

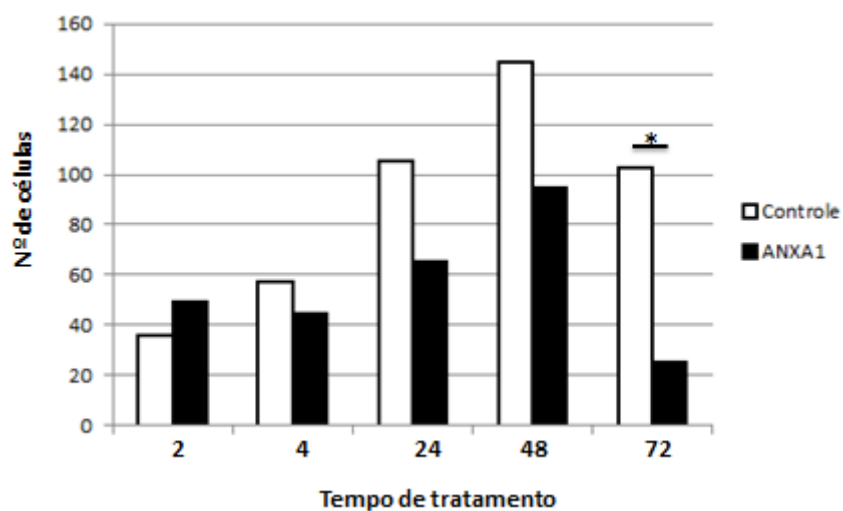


Figura 4. Análise do crescimento da linhagem SiHa, controle e tratada com 10ug/mL do peptídeo Ac₂₋₂₆, nos períodos de 2, 4, 24, 48 e 72 horas. Os resultados expressam a média de amostras em triplicata.

4.3 Ensaio de Migração Celular

Os resultados obtidos no ensaio de migração celular (Figura 5), mostram redução significativa da migração das células após o tratamento com peptídeo Ac₂₋₂₆ na concentração de 10µg/mL, nos tempos de 48 e 72h após a aplicação do teste estatístico (Figura 6).

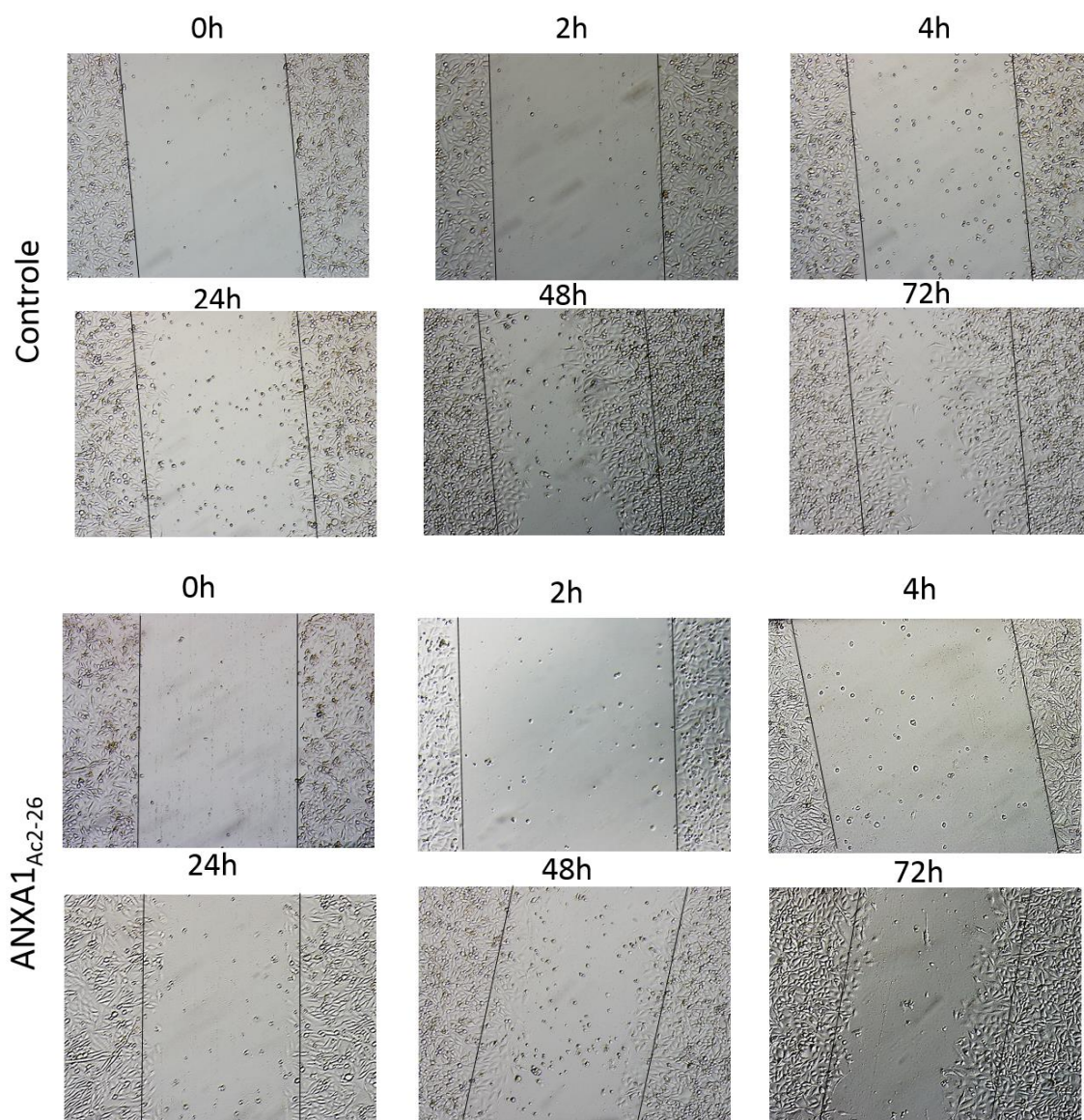


Figura 5. Efeito do peptídeo Ac_{2-26} sobre a migração celular de SiHa após 0, 2, 4, 24, 48 e 72 horas de incubação.

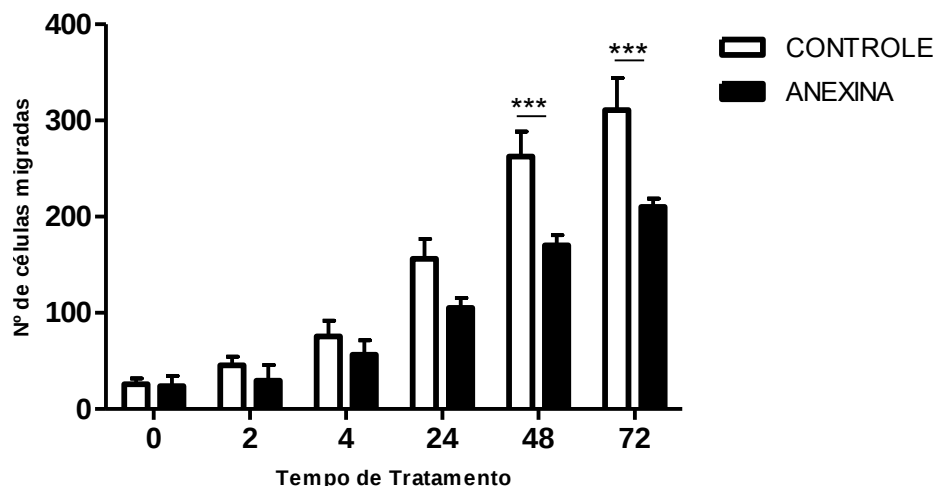


Figura 6. Quantificação das células SiHa transmigradas, controle e tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆, após 0, 2, 4, 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M. do ensaio em triplicata. *** $p < 0,001$ versus controle.

4.4 Citometria de fluxo

Os histogramas representativos (Figura 7) mostram os resultados obtidos após incubação com anexina V e PI, em cada grupo de células. A porção Q4 dos histogramas representa o nº de células viáveis, ou seja, não apresentam nenhuma marcação, enquanto a porção Q3 mostra o nº de células em apoptose. Quando as células epiteliais são incubadas com indutores de apoptose, externalizam o fosfolípídeo fosfatidilserina na membrana celular, que é marcada pela anexina V.

A anexina V é uma proteína que tem alta afinidade com a fosfatidilserina, e pela conjugação dessa com um fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) é possível quantificar o índice de apoptose por citometria de fluxo. A porção Q1 dos histogramas representa o nº de células em necrose.

Neste caso, os indutores de necrose causam o rompimento na membrana celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Assim, a incubação das células com PI, corante que possui alta afinidade para estruturas intracelulares, como o DNA, a marcação pode ser detectada pelo citômetro de fluxo. Como o PI apresenta fluorescência, conseguimos quantificar a concentração de PI existente no meio intracelular e, conseqüentemente, verificar o número de células em necrose. A porção Q2 dos histogramas

representa o número de células em apoptose tardia, demonstrando a expressão de fosfatidilserina na superfície, quando ocorre ruptura da membrana. Assim, há marcação pela anexina V e coloração com o PI, ou seja, dupla marcação.

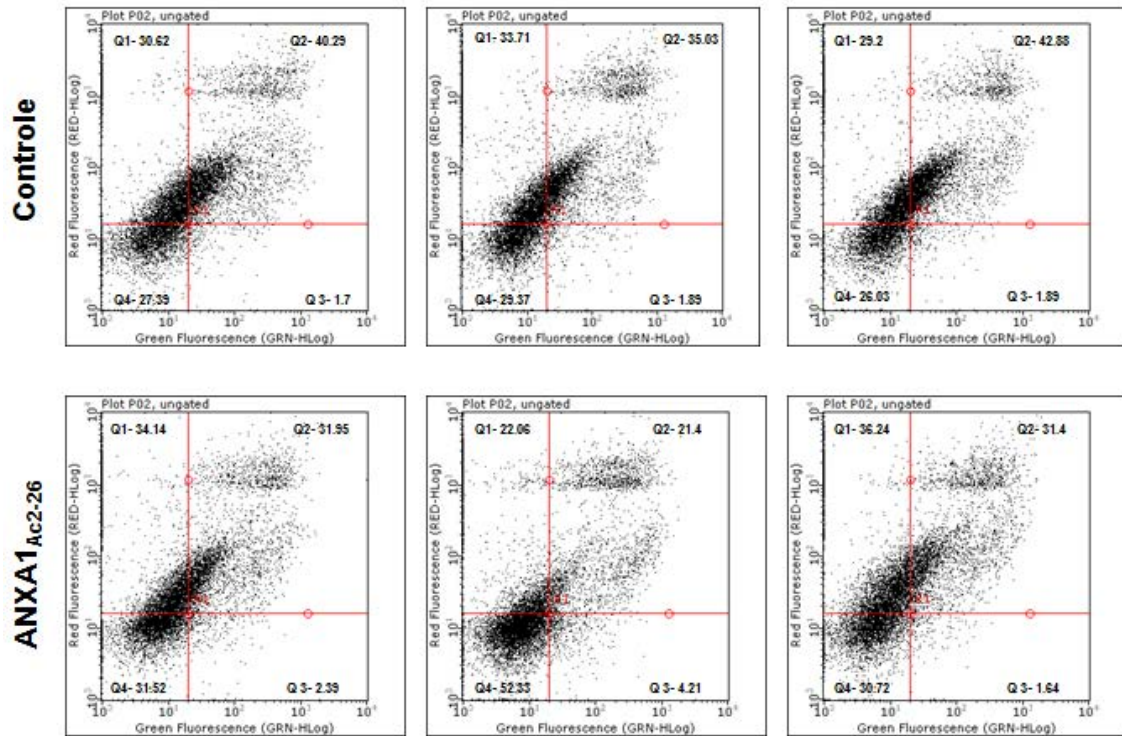


Figura 7. Histogramas obtidos da citometria de fluxo demonstrando a viabilidade (Q4), apoptose (Q3), apoptose tardia (Q2) e necrose (Q1) de células SiHa, incubadas com meio MEM (controle) ou tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆ por 72 horas, em triplicatas. A viabilidade celular foi aferida pela incubação com ANEXINA-V e/ou PI e, a intensidade de fluorescência avaliada por citometria de fluxo.

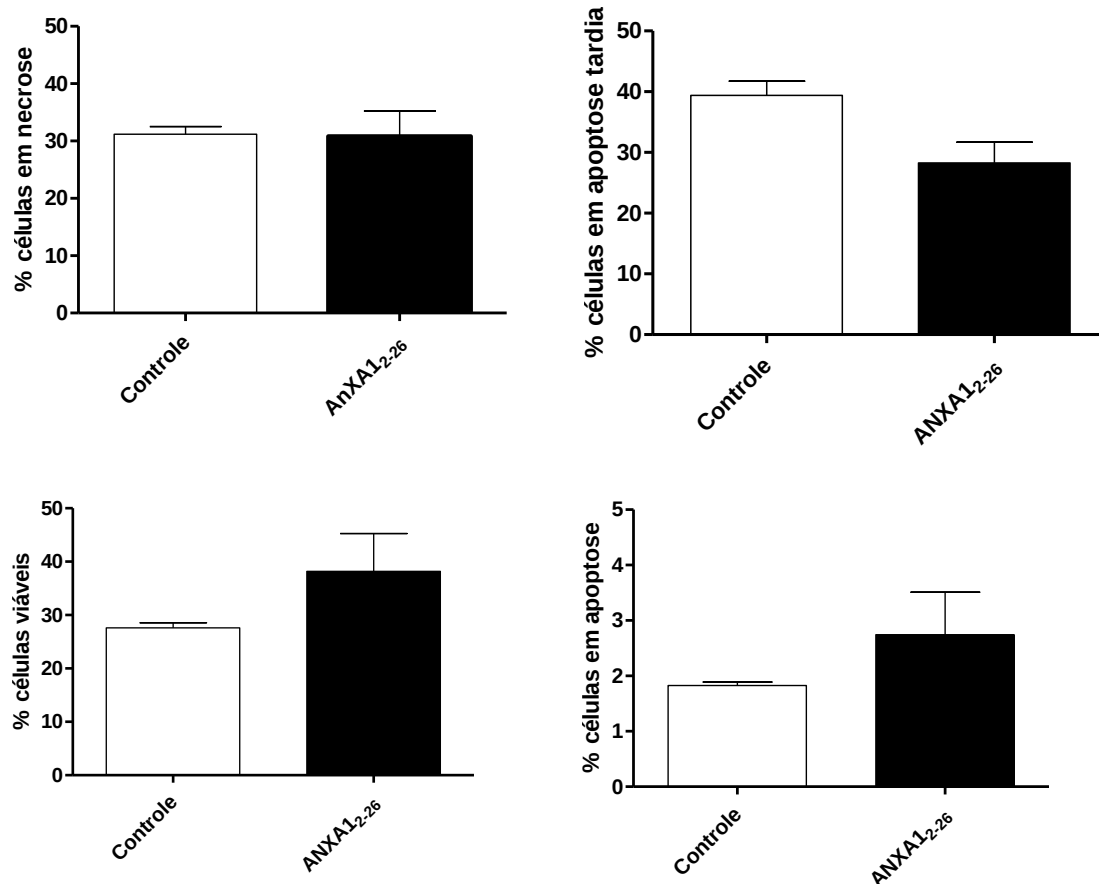


Figura 8. Efeito do tratamento com o peptídeo Ac_{2-26} após 72 horas sobre a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose de SiHa. As células SiHa foram incubadas com meio completo (MEM) (controle) ou tratadas com o peptídeo. A viabilidade celular foi aferida pela incubação com Anexina-V e/ou PI e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M de células em triplicata.

Como pode ser visto nos quatro quadrantes do histograma (Figura 7) e também nos gráficos referentes a quantidade de células nesse ensaio de citometria de fluxo (Figura 8), as células SiHa tratadas com $10\mu\text{g/mL}$ do peptídeo Ac_{2-26} após 72 horas não evidenciaram diferença significativa em relação às células controle, ou seja, o número de células viáveis, células em apoptose, em apoptose tardia e em necrose foram consideradas semelhantes.

4.5 Ensaio Multiplex: Dosagem de citocinas no sobrenadante de células SiHa após tratamento com peptídeo Ac₂₋₂₆

No ensaio Multiplex, não observamos diferenças nas concentrações das citocinas, interleucinas 1 β (IL- β), 4 (IL-4), 8 (IL-8), TNF- α e MCP-1, obtidas do sobrenadante de células SiHa controle e tratadas com 10 μ g/mL do peptídeo Ac₂₋₂₆ após serem incubadas por 72 horas. Entretanto a concentração da interleucina 6 (IL-6) teve redução significativa nas células tratadas, em relação às células controle (Figura 9).

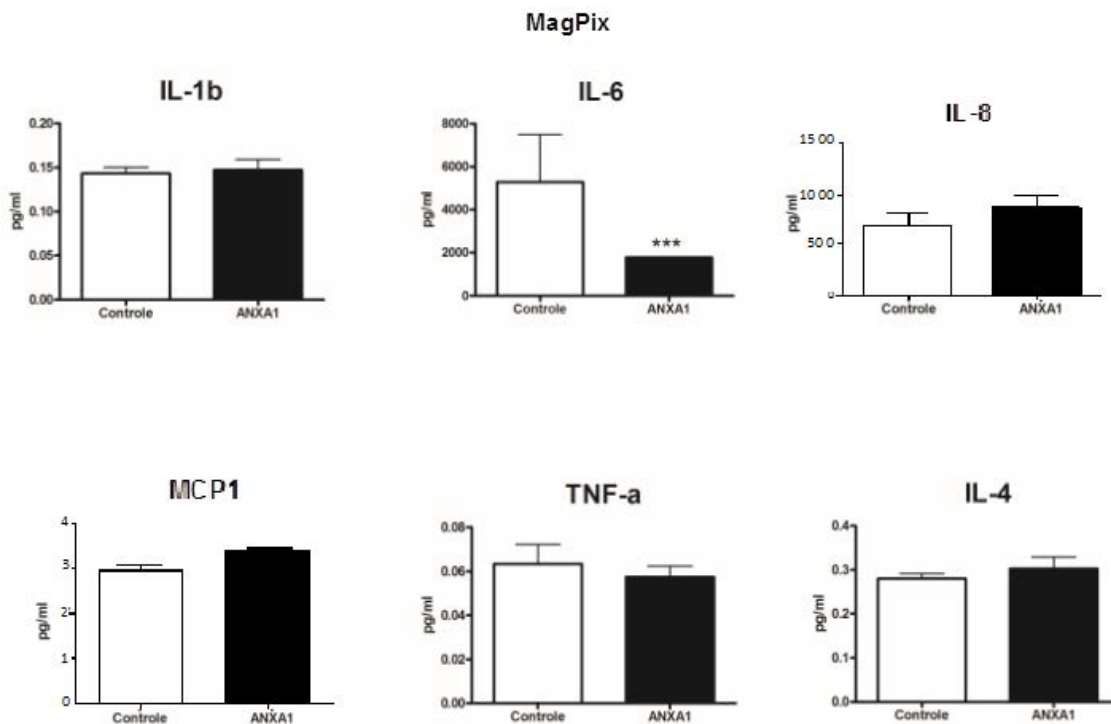


Figura 9. Efeito do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} sobre a expressão de citocinas inflamatórias. Concentração das interleucinas 1 β (IL- β), 4 (IL-4), 6 (IL-6), 8 (IL-8), TNF- α e MCP-1 em sobrenadante de cultura de células SiHa em condições controle (branco) e após o tratamento com peptídeo Ac₂₋₂₆ (preto). Dados expressos como média $\pm$ SEM do ensaio em triplicata. *** $p < 0,001$ versus controle da concentração analisada (pg/mL).

4.6 Western Blotting

A técnica de *Western blotting* foi utilizada para verificar o nível de expressão da proteína ANXA1 endógena nas células SiHa. Após o tratamento é possível perceber que não houve uma diferença significativa entre as

amostras controle e tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆, tanto na análise da membrana de PVDF (Figura 10) quanto na densitometria (Figura 11). Observa-se que o tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ não influenciou a expressão da proteína ANXA1, tanto da proteína clivada (banda de 33kDa), como da proteína total (banda de 37kDa), nem da proteína ACTB, usada como controle da reação. Supomos que o tratamento poderia alterar a expressão de algumas outras proteínas relacionadas com processos inflamatórios ou tumorigênicos, mas não a ANXA1 propriamente dita, nessas células analisadas.

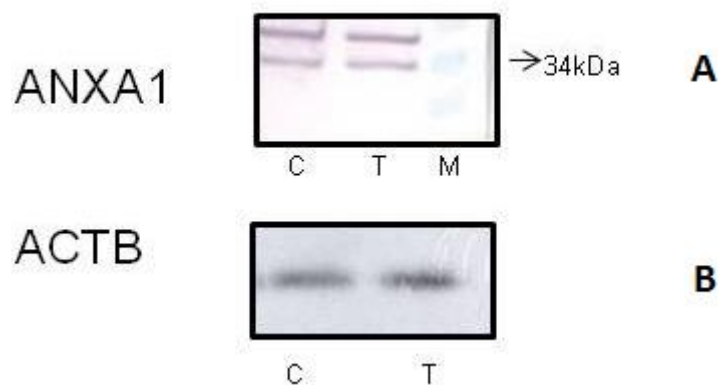


Figura 10. Membrana de PVDF, mostrando as bandas imunomarcadas (A) o anticorpo anti - ANXA1 e (B) o anticorpo anti-ACTB nas amostras de células SiHa controle (C) e SiHa tratada com o peptídeo Ac₂₋₂₆ (T) e marcador molecular (M).

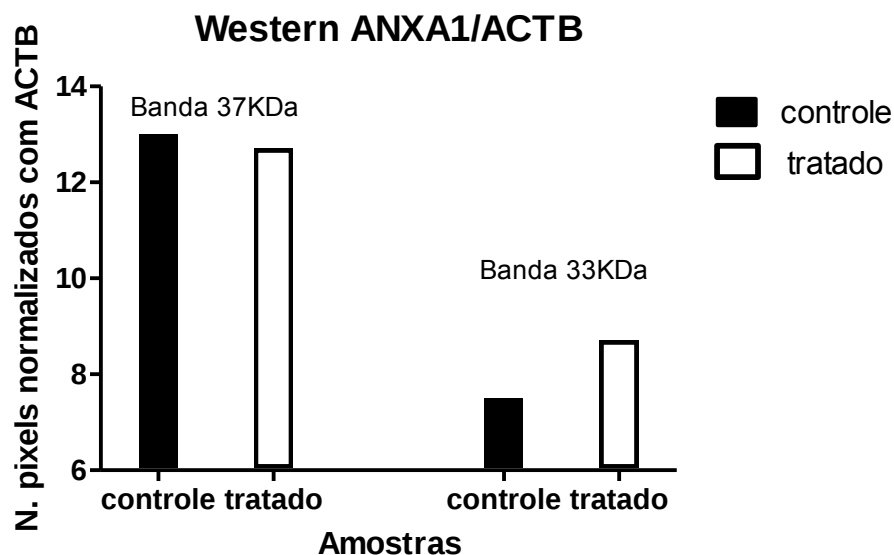


Figura 11. Densitometria da membrana de PVDF realizada com as bandas de 37kDa (ANXA1 total) e de 33kDa (ANXA1 clivada) em relação às bandas do anticorpo do ACTB para as amostras de células SiHa controle e tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆.

4.7 PCR quantitativa em Tempo Real

Previamente a PCR quantitativa em tempo real, validamos a integridade dos RNAs e cDNAs obtidos das diferentes amostras. Os resultados obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção.

Os genes de interesse (*COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*) estão envolvidos em cascatas relacionadas com inflamação e processos de invasão tumoral. As células SiHa submetidas ao tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ apresentaram redução significativa da expressão dos genes *COX2*, *EP4* e *TIMP2* comparando com as células controle (sem tratamento) (Figura 12).

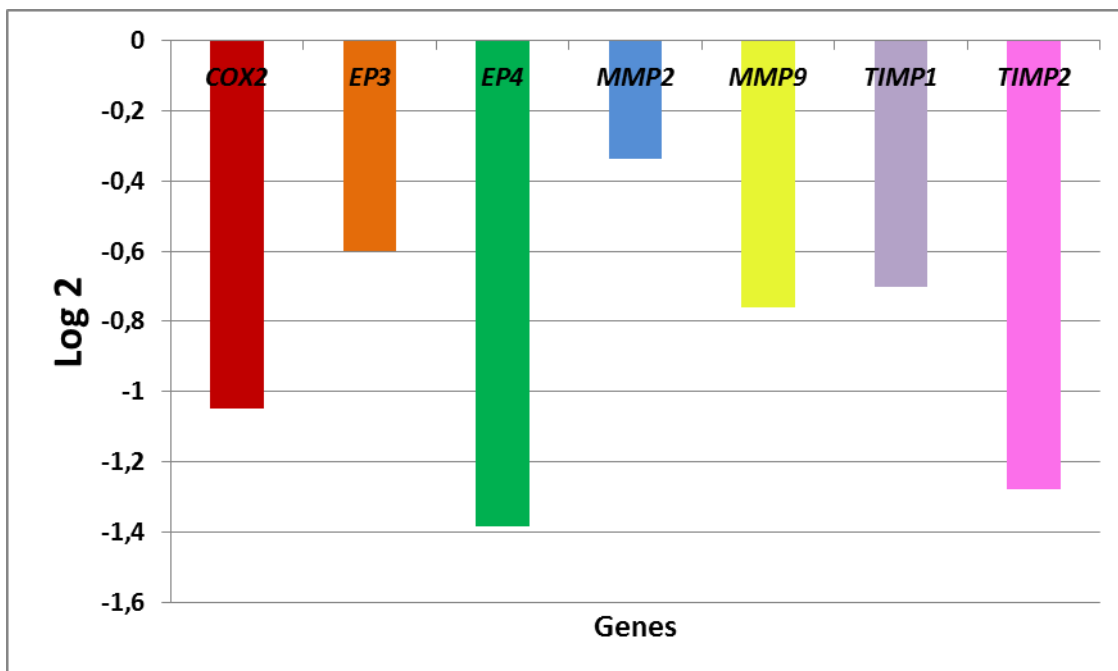


Figura 12. Análise da expressão dos genes *COX2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, por PCR em tempo real. A expressão gênica foi considerada significativa exibindo valores ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 versus controle.

O carcinoma cervical uterino representa o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres jovens, afetando especialmente populações imunocomprometidas. Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer do colo do útero são: sexo em idade precoce, múltiplos parceiros sexuais, tabagismo, contraceptivos hormonais, imunossupressão, infecções por patógenos e a contaminação pelo HPV (ROUZIER, 2014), sendo a infecção por este vírus representada por 90% dos casos de câncer cervical (FRANCO et al., 2003; JEMAL et al., 2011; JAAFAR et al., 2009; WALBOOMERS et al., 1999).

A proteína anti-inflamatória anexina A1 (ANXA1) pode ser considerada um potencial alvo terapêutico para o câncer devido ao seu envolvimento em uma ampla gama de funções, tanto no ambiente extracelular como intracelular, atuando nos processos inflamatórios, na fagocitose, apoptose, proliferação e diferenciação celular e no reparo tecidual (BIZARRO; PETRELLA; PARENTE, 2012). Entretanto, há a necessidade de maior investigação sobre atuação dessa proteína na carcinogênese cervical.

No presente trabalho, avaliando as células cultivadas da linhagem SiHa, notamos que a morfologia não foi alterada após o tratamento com peptídeo Ac₂₋₂₆ todavia, observamos a redução da proliferação celular após o tratamento. Esses dados sugerem que a ANXA1 pode estar envolvida nos mecanismos anti-proliferativos dessa linhagem celular, e corrobora com o estudo desenvolvido por Silistino-Souza e colaboradores (2007), que mostraram o efeito inibitório da ANXA1 exógena (Ac₂₋₂₆) no crescimento celular na linhagem Hep-2 de carcinoma epidermóide de laringe humano. A ANXA1 também atua no receptor do fator de crescimento epitelial (EGF), promovendo a inibição da proliferação epitelial (DE et al., 1986; RADKE et al., 2004; CROXTALL et al., 1996).

A migração celular é um evento crucial na invasão de células tumorais e metastáticas. A invasão das células tumorais em tecido circundante envolve a migração ativa dessas células através da barreira endotelial (HURD; DEGEMNARO; LEHMANN, 2011). Baseado no processo de invasão tumoral, verificamos que o peptídeo Ac₂₋₂₆ reduziu o processo de migração nas células SiHa, em relação as células controle, após 48 e 72h, sugerindo um possível potencial anti-metastático.

Na regulação da patologia do colo de útero, a inflamação desempenha um papel extremamente importante (BURN et al. 2011). Ensaios clínicos, em câncer colorretal, demonstraram que o tratamento a longo prazo com baixas doses de drogas não esteróides anti-inflamatórias (AINEs) pode ser benéfica para a redução de sua incidência. O uso de anti-inflamatório pode ser benéfico para mulheres com infecções de HPV e lesões neoplásicas, por meio da supressão do eixo inflamatório COX-PG (ciclo-oxigenase/prostaglandina), promovendo a resolução da inflamação e prevenindo a progressão do câncer de colo do útero (ADEFUYE; SALES, 2012). Estudos mostraram que a proteína anti-inflamatória anexina A1, além de atuar na proliferação celular, está associada ao processo da metástase reduzindo a migração/invasão celular em alguns tipos de tumor (ALLDRIDGE; BRYANT, 2003; WANG et al., 2004).

Em relação ao câncer e apoptose, o processo de apoptose está envolvido numa grande variedade de processos fisiológicos e patológicos (ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011; PEREIRA; AMARANTE-MENDES, 2011), por essa razão existem vários estudos que buscam mecanismos que ajudam a célula tumoral a entrar nessa condição de morte celular programada com o auxílio de várias técnicas que quantificam esse processo.

Uma dessas técnicas é o citômetro de fluxo, que utiliza a exposição da fosfatidilserina (PS) sobre a face extracelular da membrana plasmática, considerada um fator importante na transformação provocada pela apoptose (BOERSMA et al., 2005; BALASUBRAMANIAN; SCHROIT, 2003). A fosfatidilserina exposta promove o reconhecimento específico de células em apoptose através de um sinal enviado aos macrófagos (RAVICHANDRAN, 2010) solicitando a eliminação dessas células sem a ruptura da membrana plasmática e liberação do seu conteúdo citoplasmático para o meio extracelular (ELMORE, 2007). A anexina V é a marcação mais frequentemente utilizada para visualizar a apoptose em estágio inicial e caracterizar as populações de células em apoptose por citometria de fluxo (BOERSMA et al., 2005; HANSHAW; SMITH, 2005).

A necrose se diferencia da apoptose, pois há o rompimento da membrana plasmática e consequente liberação do conteúdo intracelular para o exterior da célula, esse processo pode ser identificado com o auxílio do iodeto de propídio (PI), um corante de DNA impermeável à membrana celular íntegra.

Deste modo as células apoptóticas e em necrose podem ser distinguidas baseando-se no princípio de marcação da anexina V e PI (DEMCHENKO, 2013).

A apoptose tardia é a fase da morte celular que está entre a apoptose e necrose, sendo caracterizada pela externalização da fosfatidilserina junto ao rompimento da membrana plasmática. Nessa fase, a morte celular pode ser marcada tanto pela anexina V, como pelo iodeto de propídio (PI) (ELMORE, 2007).

Nosso estudo demonstrou que nas células tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆ não mostrou indução de apoptose, apoptose tardia ou necrose. Esses dados indicam que o tratamento com Ac₂₋₂₆ não possui efeito apoptótico nesse tipo de tumor. Provavelmente esses resultados podem ter se dado em função da concentração usada do peptídeo (10ug/mL), que para esse tipo de célula pode ter sido baixa na indução da apoptose.

Na análise das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-4, IL-8, TNF- α e MCP-1 no sobrenadante das culturas das células SiHa, não foi observada diferença entre a produção destas moléculas pelas células controle e tratadas com Ac₂₋₂₆. Entretanto, a concentração da citocina IL-6 teve redução significativa nas células SiHa incubadas com Ac₂₋₂₆ por 72 horas.

A expressão aumentada de IL-6 foi associada com a gravidade de tumores cervicais, de cabeça e pescoço e de mama (TJIONG et al., 1999; IBRAHIM et al., 2013; DUFFY et al., 2008) e em linhagens de carcinoma de colo uterino SiHa e HeLa, foram observados altos níveis de IL-6 e IL-8 comparados a outra linhagem celular normal também de colo uterino (STONE et al., 2014). Mostramos em nosso estudo a redução significativa de IL-6 após a ação do Ac₂₋₂₆ corroborando com Gastardelo e colaboradores (2014) que mostraram a redução na liberação de IL-6 em células tumorigênicas de laringe submetidas ao tratamento com peptídeo Ac₂₋₂₆.

A técnica de *Western blotting*, evidenciou que a utilização do peptídeo exógeno não interfere diretamente na expressão da proteína endógena. Gao e colaboradores (2014) forneceram evidências que ANXA1 é diferencialmente expressa de acordo com o tipo de tumor. A expressão pode ser reduzida em células escamosas de carcinoma, aumentada em carcinoma pancreático, mas controversa em outros tumores gastrointestinais. Este padrão indefinido da

expressão da ANXA1 no câncer pôde ser observado em estudos realizados por Loring e colaboradores (2000), onde ocorreu aumento da expressão dessa proteína em tumores de glioblastoma multiforme, assim como em células normais de córtex. As variações de expressão da ANXA1 relatadas na literatura podem ocorrer também nos tumores de colo de útero, pelo fato destes possuírem um conjunto de células muito distintas (escamosas e glandulares). Assim, sugerimos que o tratamento com o peptídeo pode alterar a expressão de algumas outras proteínas relacionadas com vias de inflamação ou processos tumorigênicos, sem ser a expressão da ANXA1 endógena, propriamente dita.

Para complementar a investigação do efeito do peptídeo Ac₂₋₂₆ na resposta inflamatória/tumoral nas células SiHa, avaliamos a expressão de sete genes (*COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) cruciais na resposta inflamatória e no processo de invasão tumoral. O gene da proteína ciclo-oxigenase-2 (*COX-2*) é altamente expresso em diversos tumores humanos, incluindo o de colorretal, de mama e de próstata. Estudos em linhagem celular tumorigênica e em modelos de camundongos demonstram que a super expressão de *COX-2* promove impactos em vários aspectos do fenótipo maligno, incluindo o crescimento e proliferação celular desregulada, capacidade aumentada para inibir apoptose, sustentação da neovascularização, aumento do potencial metastático e disseminação invasiva (RIZZO, 2011). A proteína proveniente do gene *COX-2* catalisa o passo inicial da transformação do ácido araquidônico, tendo como produto final a prostaglandina (*PGE2*). (LARKINS et al., 2006; RIZZO, 2011.) A ligação de *PGE2* aos receptores EPs (Receptores de Prostaglandina - EP1, EP2, EP3, EP4), promove ativação e clivagem de metaloproteinases de membrana (MT-MMP) as quais interagem com pró-MMPs convertendo-as em formas ativas, bloqueando a ligação das MMPs aos seus inibidores TIMPs (Inibidores das metaloproteinases da matriz). As células cancerígenas metastáticas digerem e dissolvem a matriz extracelular (MEC) e a membrana basal, quando há secreção e ativação de MMPs que não são inibidas pelos TIMPs (LEE et al., 2011; LARKINS et al. 2006).

A degradação da membrana basal é o principal processo de invasão tumoral e desenvolvimento de metástases (STETLER-STEVENSON;

AZNAVOORIAN; LIOTTA, 1993). As proteínas multifuncionais (TIMPs) executam uma função de reguladoras endógenas das MMPs, e têm uma influência fundamental sobre a matriz extracelular, atuando sobre moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (AVADANEI et al., 2013).

O Receptor de prostaglandina *E4* (*EP4*) é expresso numa vasta gama de doenças malignas epiteliais (READER; HOLT; FULTON, 2011; SUBBARAMAIAH et al., 2008) e seu bloqueio farmacológico ou silenciamento gênico inibe a proliferação e migração *in vitro* e o crescimento e metástase *in vivo* (MA et al., 2006; YANG et al., 2006). O comportamento metastático do produto de *EP4* foi estudado em células malignas, mostrando que após a expressão desse gene ser silenciada ou antagonizada por inibidores, houve a redução do potencial metastático dessas células tumorais (KUNDU et al., 2014).

Evidenciamos em nosso estudo a redução significativa da expressão dos genes *COX-2*, *EP4* e *TIMP2* nas células tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆ em relação ao grupo controle. Apesar de poucas investigações terem avaliado o efeito do Ac₂₋₂₆ na expressão destes genes, nossos resultados mostraram que a proteína ANXA1, inibidora do *COX-2* e da *PGE2*, reduz a expressão desses genes que desencadeiam processos metastáticos (AYOUB et al., 2008). Estudos realizados por Pellikainen e colaboradores (2004) evidenciaram que *COX-2* é super expresso constitutivamente em muitas lesões pré-malignas humanas e, tumores epiteliais malignos e metastáticos, e a regulação positiva da expressão de *EP4* está funcionalmente ligada com o aumento da capacidade da célula de iniciação do tumor *in vivo* em câncer de mama (KUNDU et al., 2014). A atuação significativa do peptídeo exógeno reduz a expressão desses genes podendo contribuir na diminuição do processo de invasão tumoral.

A enzima *COX-2* é limitante para a síntese de *PGE2* a partir do ácido araquidônico e existem evidências que o esse ácido promove crescimento de células cancerígenas da próstata mediado, em parte, pela produção de *PGE2* (GUPTA et al., 2000). No câncer de próstata, *PGE2* atua como um promotor do tumor estimulando a proliferação das células e inibindo a apoptose (CAO;

PRESCOTT, 2000), inclusive o gene *COX-2* foi encontrado super expresso nesse tipo de câncer (YOSHIMURA et al., 2000).

A atividade da ANXA1 foi originalmente identificada como inibidora da fosfolipase A2 (PLA2), este fato foi proposto devido as suas ações anti-inflamatórias (ERRASFA; RUSSO-MARIE, 1989). Além da ação inibitória da atividade de PLA2, a proteína também inibe a produção de ácido araquidônico (BASTIAN et al., 1993).

O gene *TIMP-2*, que também teve a sua expressão reduzida de forma significativa após o tratamento com peptídeo *Ac₂₋₂₆*, desempenha um papel amplo no desenvolvimento do câncer (BOURBOULIA et al., 2013). Esse gene foi estudado por Thang e colaboradores (2013) e observaram que, em altas concentrações, ele promoveu aumento na proliferação da linhagem celular *BeWo* de coriocarcinoma (tumor trofoblástico gestacional) mediando o processo de invasão celular. Entretanto, descobertas propostas por Honkavuori-Toivola e colaboradores (2012) sugerem que *TIMP-2* inibe a invasão de células tumorais de carcinoma de endométrio, suportando a teoria de que *TIMP-2* inibe a *MMP-2* neste tipo de carcinoma. *TIMP-2* é encontrado como um complexo junto à *MMP-2*, uma enzima que está intimamente ligada à invasão das células tumorais, assim evidenciamos seu papel controverso na invasão e propagação tumoral.

Poucas investigações têm avaliado o efeito do peptídeo *Ac₂₋₂₆* na expressão dos genes estudados, mas nossos estudos mostram que o peptídeo pode estar relacionada promovendo a redução significativa da expressão de *COX2*, *EP4* e *TIMP2*.

Em função desses resultados, podemos propor o uso do peptídeo como alternativa terapêutica, devido ao importante papel de bloqueio que esse pode exercer na via inflamatória e de invasão tumoral por possivelmente suprimir a expressão de genes relacionados com a via oxidativa do ácido araquidônico. Além disso, *Ac₂₋₂₆* mostrou-se eficiente na ação antiproliferativa, antimigratória e na redução da concentração da citocina IL-6 em carcinoma de colo de útero. No entanto, estudos ainda são necessários para especificar os mecanismos de ação desse peptídeo anti-inflamatório no desenvolvimento tumoral.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a linhagem celular SiHa tratadas com o peptídeo Ac₂₋₂₆, em relação às células controles, permitem concluir:

- Não modifica a morfologia celular, mas diminui a proliferação e a migração celular;
- Não altera a expressão da proteína ANXA1 endógena;
- Reduz significativamente a expressão dos genes *COX-2*, *EP4* e *TIMP2*;
- Não altera a apoptose, apoptose tardia e necrose.
- Reduz de forma significativa a concentração de IL-6 no sobrenadante das células SiHa tratadas com peptídeo.

Essas conclusões mostram que o peptídeo Ac₂₋₂₆ altera a proliferação e a migração celular, reduz a concentração de uma citocina pró-inflamatória além da expressão dos genes nas células estudadas. Assim, os nossos resultados apontam o peptídeo Ac₂₋₂₆ como um alvo potencial das atividades gênicas, sendo possível sua indicação em terapias inovadoras no tratamento de carcinomas de colo uterino.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAO, A. C. et al. A role for COX2- derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. **Oral Oncol**, v. 46, n. 12, p. 880-7, 2010.
- ADEFUYE A. and SALES K. Regulation of Inflammatory pathways in Cancer and Infectious Disease of the Cervix. **Hindawi Publishing Corporation Scientifica**, 2012.
- AGGARWAL, B. B. et al. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 11, p. 1605-21, 2006.
- AGGARWAL, B. B.; GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 4, p. 351-69, 2009.
- AGGARWAL, B. B. et al. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 2, p. 425-30, 2009.
- ALCÁZAR J.L., ARRIBAS S., MÍNGUEZ J.A., JURADO M. The role of ultrasound in the assessment of uterine cervical câncer. **J Obstet Gynaecol**, v. 64, n. 5, p. 311-6, Out, 2014.
- ALLDRIDGE, L. C.; BRYANT, C. E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. **Exp Cell Res**, v. 290, n.1, p. 93-107, Oct 2003.
- AVADANEI, R. et al. High variability in MMP2/TIMP2 and MMP9/TIMP1 expression in secondary liver tumors. **Rom J Morphol Embryol**. Vol. 54, n. 3, p. 479–485, 2013.
- ALVES, V.A.F. et al. Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology*, Oxford. v.53, p.715 - 27, 2008.
- AYOUB, S., YAZID, S.; FLOWER, R. Increased susceptibility of annexin A1 null mice to nociceptive pain is indicative of a spinal antinociceptive action of annexin A1. **Br J Pharmacol**, May 2008.
- BASTIAN, B. C. et al. inhibition of human skin phospholipase A2 by -lipocortins” is an indirect effect of substrate/lipocortin interaction. **J. Invest. Dermatol**. v. 101, p.359–363, 1993.
- BALASUBRAMANIAN K., SCHROIT A.J. Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. **Annu Rev Physiol**, v. 65, p. 701–34, 2003.

- BIZZARRO, V., PETRELLA, A., PARENTE, L. Annexin A1: Novel Roles in Skeletal Muscle Biology. **Journal Of Cellular Physiology**. V. 227, p. 3007–3015, 2012.
- BOERSMA HH et al. Past, present, and future of annexin a5: From protein discovery to clinical applications. **J Nucl Med**, v. 46, p. 2035–50, 2005.
- BOLLRATH, J. et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, p. 91-102, 2009.
- BOURBOULIA D., HAN H., JENSEN-TAUBMAN S., GAVIL N., ISAAC B., WEI B., NECKERS L. and STETLER-STEVENSON W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol.** vol. 20, n. 3, p. 161-168, 2013.
- BURN J. et al., Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. **Lancet**, vol. 378, n. 9809, p. 2081–2087, 2011.
- CARMELIET, T P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, London. v. 407, n.6801, p.249-57, 2000.
- CAO Y.; PRESCOTT, S.M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **J Cell Physiol.**, v. 190, p. 279–86, 2000.
- CHUNG, S.H.; FRANCESCHI, S.; LAMBERT, P.F. Estrogen and ERalpha: culprits in cervical cancer? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York. v.21, n.8, p. 504-1, 2010.
- CIRINO, G. et al. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. **British Journal of Pharmacology**, London. v.108, n.3, p.573-4, 1993.
- CLEVERS, H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, Cambridge. v.118, n.6, p.671-4, 2004.
- CONDEELIS, J.; POLLARD, J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, Cambridge. v.124, n.2, p. 263-6, 2006.
- COPPOLA J.M. et al. Noninvasive imaging of apoptosis and its application in cancer therapeutics. **Clin Cancer Res**, v. 14, p. 2492–501, 2008.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, London. v. 420, n.6917, p.860–867, 2002.

CROXTALL, J. D. et al. Lipocortin 1 and the control of cPLA2 activity in A549 cells. Glucocorticoids block EGF stimulation of cPLA2 phosphorylation. **Biochemistry Pharmacology**, Londres, v. 52, n. 2, p.351-356, 26 jul. 1996.

DAMAZO, A.S. et al. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. **The American Journal of Pathology**, Bethesda. v. 166 p. 1607-1617. 2005.

DAMAZO, A.S. et al. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. **Journal of Immunology**, Baltimore; v.176 p. 4410-4418. 2006.

DE, B. K. et al. A calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. **J Biol Chem**, v. 261, n. 29, p. 13784-92, Oct 1986.

DEMCHENKO, A.P. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. **Cytotechnology**, v. 65, p. 157–172, 2013.

DUENAS-GONZALEZ A, SERRANO-OLVERA A, CETINA L, CORONEL J. New molecular targets against cervical cancer. **Int J Womens Health**, v. 5, n. 6, p. 1023-31, Dez, 2014.

DUFFY, S. et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. **Cancer**, v. 113, n. 4, p. 750–757, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-16, 2007.

ERRASFA, M. and RUSSO-MARIE, F. (1989) A purified lipocortin shares the anti-inflammatory effect of glucocorticosteroids in vivo in mice. **Br. J. Pharmacol.** v.97, p. 1051-1058, 1989.

ERNST, J.D. et al. Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca²⁺(+)-dependent aggregation of isolated specific granules. **Journal of Clinical Investigation**, NewYork. v.85, n.4, p.1065-71, 1990.

FARROW, B. et al. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. **Annals of Surgery**. Philadelphia v.239, n.6, p.763-9, discussion p.769-71, 2004.

FEDERICO, A. et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **Int J Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2381-6, 2007.

FLOWER, R.J. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology*, London. v.94, p. 987-1015. 1988.

FRANCO, E.L.; SCHLECHT, N.F.; SASLOW, D. The epidemiology of cervical cancer. **Cancer Journal**, Villejuif. v.9, n.5, p. 348-59, 2003.

FREITAS L. B. et al. Human Papillomavirus 16 Non-European variants are preferentially associated with High-Grade cervical lesions. **PLOS ONE**. Vol. 9, July 2014.

GAO, Y. et al. Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers. **Bmc Cancer**, Shanghai, China, v. 14, n. 1, p.520-531, 19 jul. 2014.

GASTARDELO, T. S.; DAMAZO, A. S.; DALLI, J.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptors in extravasating neutrophils during acute inflammation. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 174, n. 1, p. 177-183, Jan., 2009.

GASTARDELO et al. Inflammation and câncer: Role of Annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.

GAVINS, F.N. et al. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **FASEB Journal**, Bethesda. v.21, n.8, p.1751-8, 2007.

GAVINS, F.N. et al. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, New York. v.101, n.10, p.4140-7, 2003.

GIBBS, L. et al. Time-dependent expression of annexin 1 in a model of chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel. v.51, n.6, p.300-6, 2002.

GIL, C.D. et al. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflammation Research**, Basel. v.55, n.3, p.99-107, 2006.

GOULDING, N.J. et al. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. **Lancet**, London. v.335, n.8703, p.1416-8, 1990.

GRETEN, F.R. et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, Cambridge. v.118, n.3, p.285-96, 2004.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Ann Rheum Dis**, v. 70 Suppl 1, p. i104-8, 2011.

GUEDEZ L., JENSEN-TAUBMAN S., BOURBOULIA D., KWITYN C. J., WEI B., CATERINA J., AND STETLER-STEVENSON W. G. TIMP-2 targets tumor associated-myeloid suppressor cells with effects in cancer immune dysfunction and angiogenesis. **J Immunother**. Vol. 35, n. 6, p. 502–512, July, 2012.

GUPTA, S. et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. **Prostate**, v.42, p. 73-78, 2000.

HANSHAW R.G., SMITH B.D. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. **Bioorg Med Chem**, v.13, p. 5035–42, 2005.

HONKAVUORI-TOIVOLA, Maria et al. Immunoreactivity for TIMP-2 is associated with a favorable prognosis in endometrial carcinoma. **Tumor Biology**, Oulu, Finland, v. 33, n. 4, p.935-941, 21 jan. 2012.

HURD, T.R., DEGENNARO, M., LEHMANN, R. Redox regulation of cell migration and adhesion. **Trends Cell Biol**. vol. 22, p. 107–115, 2011.

IBRAHIM, S. A. et al. Syndecan-1 (CD138) modulates triplenegative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6-mediated STAT3 signaling. **PLoS ONE**, v. 8 2013.

INCASSATI, A. et al. Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. **Oncogene**, Basingstoke. v.25, n.17, p. 2444-51, 2006.

JAAFAR, F. et al. Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. **The American Journal of Pathology**, Bethesda. v.175, n.4, p.1525-35, 2009.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: Cancer Journal of Clinicians**, New York, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr., 2011.

KUNDU N., XINRONG MA, KOCHER T., GOLOUBEVA O., STAATS P., THOMPSON K., MARTIN S., READER J., TAKE Y., COLLIN P., FULTON A. Prostaglandin E receptor EP4 is a therapeutic target in breast cancer cells with stem-like properties. **Breast Cancer Res Treat**. Vol.143, p. 19–31, 2014.

LARKINS T. L. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. **BMC Cancer**. Vol. 6, n. 181, 2006.

LEE, Y. S.; CHUNG, H. W.; MOON, H. S. The expression of annexin I and thymosin beta4 in cervical cancer. **Korean Journal of Obstetrics & Gynecology**, Seoul, v. 51, p. 313–323, Mar. 2008.

LEE, J., S.K. BANU, et al. Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits invasions of human immortalized endometrial epithelial and stromal cells through suppressions of metalloproteinases. **Mol Cell. Endocrinol**. vol.332, n.1-2, p. 306-13, Jan 30, 2011.

LEE, J. et al. Early pregnancy induced expression of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 in the ovine endometrium and regulated by interferon tau through multiple cell signaling pathways. **Mol Cell Endocrinol**, v. 348, n. 1, p. 211-23, 2012.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1175-83, 2007.

LOGING, W. T. et al. Identifying Potential Tumor Markers and Antigens by Database Mining and Rapid Expression Screening. **Genoma Research**, Durham, Usa, v. 10, n. 9, p.1393-1402, 18 jul. 2000.

LOPEZ, J. et al. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. **BioMed Central Cancer**, London. v.12, p.48, 2012.

MA, X. et al. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. **Cancer Res**. v. 66, p. 2923-2927, 2006.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, Tokyo. v.98, n.10, p.1505-11, 2007.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 2, p. 83-9, 2011.

OLIANI, S.M. et al. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel. v.57, n.10, p. 450-6, 2008.

OLIANI, S.M.; PERRETTI, M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. **Italian journal of anatomy and embryology**, Firenze. v.106, n.2 Suppl 1, p.69-77, 2001.

OLIANI, S.M.; DAMAZO, A.S.; PERRETTI, M. Annexin 1 localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators of Inflammation**, Sylvania v. 11, n. 5, p. 287-92. 2002.

OLIANI, S.M. et al. Neutrophil interaction with inflamed post-capillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American Journal of Pathology**, Bethesda. v. 158, p. 603-615. 2001.

ONGENAERT, M. et al. Discovery of DNA methylation markers in cervical cancer using relaxation ranking. **BMC Medical Genomics**, London v.24; p.1-57, 2008.

PARADKAR P. H., JOSHI J. V., MERTIA P. N., AGASHE S. V., VAIDYA R. A. Role of Cytokines in Genesis, Progression and Prognosis of Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. Vol. 15, n. 9, p. 3851-3864, 2014.

PECTASIDES, D. et al. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. **Cancer Treatment Review**, London. v.34, n.7, p.603-13, 2008.

PELLIKAINEN, J. M. et al. Expression of matrix metalloproteinase (MM P)-2 and MM P-9 in breast câncer with a special reference to activator protein-2, HER 2, and prognosis. **Clin Cancer Res**. Vol. 10, 2004.

PEREIRA W.O., AMARANTE-MENDES G.P. Apoptosis: A programme of cell death or cell disposal? **Scand J Immunol**, v. 73, p. 401-7, 2011.

PERRETTI, M.; GAVINS, F.N. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. **News Physiol Sci**, Bethesda.v.18, p.60-4, 2003.

PERRETTI, M. et al. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. **The American Journal of Pathology**, Bethesda. v. 158, n.6, p.1969-73, 2001.

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leucocyte-endothelium interaction. **Trends Pharmacological Sciences**. v. 18, p. 418-425. 1997.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v. 9, n. 29, p. 2002-2007, 2001.

PORTA, C. et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology**, v. 214, n. 9-10, p. 761-77, 2009.

PRATES, J. Investigação da expressão gênica diferencial em resposta aos efeitos da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero. 2014. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP.

RADKE, S. et al. Specific association of annexin-1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain. **FEBS Lett**, v. 578, n. 1-2, p. 95-8, Dec 2004.

RAMEZ N. E., KRISHNANSU S. T. Immunotherapy: Na Evolving Paradigm in the treatment of advanced cervical câncer. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 1, p. 20-38, Jan., 2015.

RAVICHANDRAN K.S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: Progress and conundrums. **J Exp Med**, v. 207, p. 1807–17, 2010.

RAYNAL, P.; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam. v. 1197, p. 63-93. 1994.

READER JC, HOLT D, FULTON AM Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. **Cancer Metastasis Ver**. Vol. 30, p. 449–463, 2011.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of cell science**, London. v. 117, n. 13, p. 2631-9, 2004.

RIZZO, M. T. Cyclooxygenase-2 in oncogen. **Clínica Chimica Acta**, vol. 412, p. 671–687, 2011.

RODRIGUES-LISONI, F.C. et al., Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions. **BMC Medical Genomics**, London. v.4, n.3, p.14, 2010.

RODRIGUES-LISONI, F. C.; HENRIQUE, T.; TAJARA, E. H. ANXA1 (annexin A1). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, v. 15, n. 2, p. 117-121, 2011.

RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O.W.; BISSELL, M.J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiological reviews**, Baltimore. v.76, n.1, p. 69-125, 1996.

ROUZIER, R. Epidemiology and risk factors for cancer of the uterus. **Rev Prat**. v.64, p. 774-779, 2014.

SALGADO, R. et al. Circulating basic fibroblast growth factor is partly derived from the tumour in patients with colon, cervical and ovarian cancer. **Angiogenesis**, London. v.7, n.1, p. 29-32, 2004.

SANSONE, P.; BROMBERG, J. Environment, inflammation, and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 21, n. 1, p. 80-5, 2011.

SHAO-MING W.,YOU-LIN Q. Implementation of cervical cancer screening and prevention in China—challenges and reality. **Jpn. J. Clin. Oncol**, v. 45, n.1, p. 7-11, 2015.

SHEN, L. et al. Proteomic analysis of lanthanum citrate-induced apoptosis in human cervical carcinoma SiHa cells. **Biometals**, Oxford. v. 23, n.6, p.1179-89, 2010.

SILISTINO-SOUZA, R. et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **International journal of cancer**, New York. v. 120, n.12, p. 2582-9. 2007.

STETLER-STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S, LIOTTA LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Annu Rev Cell Biol**. Vol. 9, p. 541–73, 1993.

STONE, S. C. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 2, p. 63-75, 2014.

SOTO-DE LEON, S. et al. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. **PLoS One**, San Francisco. v.6, n.2, e14705, 2011.

SUBBARAMAIAH K. et al. EP2 and EP4 receptors regulate aromatase expression in human adipocytes and breast cancer cells: evidence of a BRCA1 and p300 exchange. **J Biol Chem**. Vol. 283, p. 3433–444, 2008.

THANG, N. M. et al. Overexpression of Endogenous TIMP-2 Increases the Proliferation of BeWo Choriocarcinoma Cells Through the MAPK-Signaling Pathway. **Sage**, Osaka, Japan, v. 20, n. 10, p.1184-1192, 20 fev. 2013.

TLSTY, T.D.; HEIN, P.W. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. **Current opinion in genetics & development**, London. v.11, n.1, p. 54-9, 2001.

ULUKAYA E., ACILAN C., YILMAZ Y. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? **Cell Biochem Funct**, v. 29, p. 468-80, 2011.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of pathology**, London. v. 189, n.1, p.12-9, 1999.

WANG, Y. et al. Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 314, n.2, p. 565-70, Feb 2004.

YANG, L. et al. Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism. **Cancer Res**. Vol. 66, p. 9665–9672, 2006.

YEW, C.W. et al. A novel MLL5 isoform that is essential to activate E6 and E7 transcription in HPV16/18-associated cervical cancers. **Cancer research**, Baltimore. v.71, n.21, p. 6696-707, 2011.

YOSHIMURA, R. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. **Cancer**. V. 89, p. 589-596, 2000.

ZHANG, Y. et al. Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London. v. 30, p.98, 2011.

ZIJLMANS, H.J. et al. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer. **British journal of cancer**, London. v.100, n.10, p.1617-26, 2009.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura