



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Sara de Souza Costa

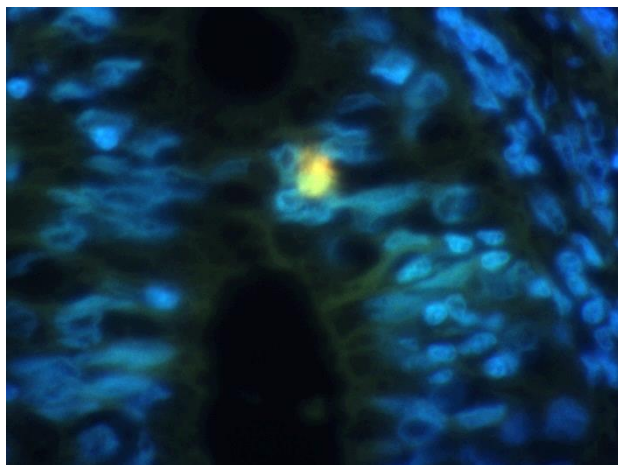
**ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE DOS MASTÓCITOS E EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA ANEXINA A1 E RECEPTOR FPR EM VARIÁVEIS CLINICO-
PATOLÓGICAS DE LESÕES UTERINAS**

São José do Rio Preto, SP

2017

Sara de Souza Costa

Análise da heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína Anexina A1 e receptores FPR em variáveis clínico-patológicas de lesões uterinas



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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Girol

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

São José do Rio Preto, SP

2017

Costa, Sara de Souza.

Análise da heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína Anexina A1 e receptores FPR em variáveis clínico-patológicas de lesões uterinas / Sara de Souza Costa.-- São José do Rio Preto, 2017

61 f.: il.

Orientador: Ana Paula Girol

Coorientador: Sonia Maria Oliani

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

1. Neoplasias uterinas. 2. Útero - Tumores. 3. Útero - Câncer.
4. Marcadores biológicos de tumores. 5. Mastócitos. 6. Anexina A1.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU - 616-006.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Sara de Souza Costa

Análise da heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína Anexina A1 e receptores FPR em variáveis clínico-patológicas de lesões uterinas

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

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Girol
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Ayder Anselmo Gomes Vivi
FIPA – Catanduva

Prof^a. Dr^a Cristiane Damas Gil
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
2017

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Ednéia e Odemir, pessoas que amo e meus melhores mentores; pelo carinho, apoio incondicional, por não terem medido esforços para que eu alcançasse meus objetivos e por me estimular no crescimento profissional e pessoal.

À minha orientadora, Profª Drª Ana Paula Girol, meu respeito e reconhecimento pela competência e brilhantismo profissional. Além da fundamental importância na minha formação, permitindo meu crescimento profissional e enriquecendo minhas experiências pessoais. Foi essencial para a finalização deste trabalho, com paciência, amizade, dedicação e determinação, sendo referência pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Porque nada é possível sem apoio, reconheço a importância e agradeço:

À Deus que me permitiu alcançar mais essa etapa da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado concedida.

À Prof^a Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), e aos demais professores do programa.

À minha coorientadora, Prof^a Dra. Sonia Maria Oliani, pela participação fundamental neste trabalho e por todo conhecimento adquirido.

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), e a todos os funcionários pela atenção e colaboração.

Às Faculdades Integradas da Fundação Padre Albino (FIPA) pelo uso de suas dependências, o Laboratório de Histopatologia, Imuno-histoquímica e Laboratório Multidisciplinar.

Ao Prof. Mairto Roberis Geromel, técnico do Laboratório de Histopatologia das FIPA, excelente profissional, cuja colaboração foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Às técnicas e amigas do laboratório, Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon e Helena Ribeiro Souza, que me auxiliaram com todo carinho, alegria e disposição neste trabalho.

Ao querido amigo Lucas Possebon, por quem tenho carinho especial, pelo apoio e incentivo constante.

Aos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Janesly Prates, Juscielle Brogin Moreli, Lucas Azevedo, Mab Pereira Corrêa, Rafaela Molás, pela atenção, alegria constante e entusiasmo.

À minha família, em especial, meu irmão Samuel, pela confiança, por me estimular no crescimento profissional e amadurecimento pessoal.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração deste trabalho no qual dificilmente poderiam ser devidamente citadas, sem que se cometesse a injustiça do esquecimento, meu agradecimento.

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistas daquilo que parecia impossível”.

Charles Chaplin.

APRESENTAÇÃO

A identificação e avaliação precoce de lesões no aparelho reprodutivo feminino tem papel fundamental na prevenção de diversos tumores ginecológico, como o adenocarcinoma de endométrio. Diversos estudos têm buscado o entendimento das subpopulações dos mastócitos na inflamação e neoplasias uterinas, enquanto a proteína Anexina A1 é grandemente relacionada a processos inflamatórios e desenvolvimentos tumorais, por meio da interação com o receptor FPR.

Nesta investigação, buscamos aprofundar o conhecimento sobre a heterogeneidade dos mastócitos, bem como analisar o envolvimento ANXA1/FPR nas lesões uterinas, na busca de subsídios para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos relacionados ao útero. O conjunto dos resultados obtidos está sendo usado na confecção do manuscrito intitulado "Role of mast cell subpopulations and specific ANXA1/FPR1 Interaction in different clinical-pathological uterine conditions" que será submetido à revista *Fertility and Sterility* (ISSN 0015-0282).

Paralelamente ao trabalho desenvolvido no mestrado, foi possível colaborar em outros projetos de pesquisa envolvendo a proteína ANXA1, sob orientação da Professora Dra. Ana Paula Girol, nas Faculdades Integrada Padre Albino (FIPA), entre eles, uma investigação sobre a expressão da ANXA1 em astrocitomas de diferentes graus de malignidade, cujos dados estão compilados no manuscrito "Expression of the Annexin A1 protein and its correlation with matrix metalloproteinases and the receptor for formylated peptides in astrocytomas of different degrees of malignancy", em fase final de redação e que será submetido à revista internacional *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* (ISSN 1084-9785).

Ainda, o trabalho de iniciação científica desenvolvido anteriormente durante meu Bacharelado em Ciências Biológicas, também orientado pela Prof^a. Ana Paula Girol, possibilitou a redação do artigo "Anexina A1 e metaloproteinases de matriz em neoplasias uterinas", que foi aceito pela revista indexada *CuidArte Enfermagem* (ISSN 1982-1166) e será publicado no seu próximo volume. Este artigo segue anexado na íntegra.

RESUMO

As lesões uterinas são causas importantes de desconforto, infertilidade e óbito entre as mulheres no Brasil e no mundo. O câncer de endométrio é um tumor maligno frequente e sua incidência vem aumentando nas últimas décadas. Enquanto, o tumor uterino benigno mais comum, o leiomioma, acomete cerca de 40% das mulheres na idade reprodutiva, sendo relacionado à menorragia, dismenorreia e infertilidade. Investigações indicam que o microambiente tumoral é crucial para o avanço do câncer, sendo caracterizado, principalmente, pela composição alterada da matriz extracelular, alta densidade de microvasos e abundância de células inflamatórias, como mastócitos (MCs). MCs desgranulados liberam fatores quimiotáticos e proteases, como triptase e quimase, para o meio extracelular, contribuindo na degradação da matriz extracelular, promoção da angiogênese, propiciando ambiente favorável para invasão tumoral e remodelação tecidual por meio de proteólises seletivas na matriz e ativação de metaloproteinases. Outro aspecto importante no crescimento tumoral é a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1), relacionada à regulação dos processos de crescimento e migração/invasão celular, sendo seus efeitos mediados por receptores para peptídeos formilados (FPRs), especialmente FPR1 e FPR2. Diante da importância dos MCs e da ANXA1/FPR no desenvolvimento tumoral, o objetivo desta investigação foi analisar a heterogeneidade dos MCs e a expressão das proteínas ANXA1, FPR1 e FPR2 em biópsias humanas das variáveis clínico-patológicas de útero normal: hiperplasia endometrial simples (HES), adenomiose, leiomiomas e adenocarcinoma (ADC) endometrial de graus I e II. Os MCs foram quantificados de acordo com seu estado de ativação e expressão das proteases triptase e quimase. A expressão da ANXA1 e seus receptores FPR1 e FPR2 nos MCs e tecidos uterinos foram analisadas nas diferentes biópsias estudadas. Nossos resultados mostraram MCs intactos e desgranulados, no endométrio e miométrio normais e aumentados na HES, margens tumorais nos leiomiomas, adenomiose e ADC endometrial de graus I e II, e diminuídos significativamente na região tumoral do leiomioma. Com relação à heterogeneidade, os MCs triptase-positivos foram observados em maior quantidade. As expressões endógenas da ANXA1 e do FPR1 foram observadas nos tecidos uterinos e MCs, com ausência para o FPR2. As modulações dos MCs, da proteína ANXA1 e de modo específico do receptor FPR1, nas variáveis clínico-patológicas das lesões uterinas investigadas indicam o envolvimento dessas células e a interação ANXA1/FPR1 no desenvolvimento de inflamação e neoplasia uterina.

Palavras chave: neoplasias, mastócitos, Anexina A1, receptores para peptídeos formilados, biomarcadores tumorais, alvos terapêuticos.

ABSTRACT

Uterine lesions are important causes of discomfort, infertility and death among women in Brazil and in the world. Endometrial cancer is a frequent malignant tumor and its incidence has been increasing in the last decades. Besides, the most common benign uterine tumor, leiomyoma, affects about 40% of women at reproductive age, being related to menorrhagia, dysmenorrhea and infertility. Investigations indicate that the tumor microenvironment is crucial for the advancement of cancer, being characterized mainly by the altered composition of the extracellular matrix, high microvessel density and abundance of inflammatory cells, such as mast cells (MCs). Degranulated MCs release chemotactic and protease factors, such as tryptase and chymase, to the extracellular medium, contributing to the degradation of the extracellular matrix, promoting angiogenesis, providing a favorable environment for tumor invasion and tissue remodeling through selective proteolysis in the matrix and activation of metalloproteinases. Another important aspect of tumor growth is the anti-inflammatory protein Annexin A1 (ANXA1), related to the regulation of growth and migration / invasion processes, and its effects mediated by receptors for formylated peptides (FPRs), especially FPR1 and FPR2. The objective of this investigation was to analyze the heterogeneity of the MCs and the expression of the ANXA1, FPR1 and FPR2 proteins in human biopsies of clinical-pathological variables of normal uterus: simple endometrial hyperplasia (HES), adenomyosis, leiomyomas and endometrial adenocarcinoma (ADC) of grades I and II. MCs were quantified according to their state of activation and expression of tryptase and chymase proteases. Expression of ANXA1 and its FPR1 and FPR2 receptors in the MCs and uterine tissues were analyzed in the different biopsies studied. Our results showed intact and degranulated MCs in the normal endometrium and myometrium and increased MCs in HES, tumor margins in leiomyomas, adenomyosis and endometrial ADC of grades I and II, but significantly decreased in the leiomyoma tumor region. In relation to the heterogeneity, it was observed that the tryptase-positive MCs were observed in greater quantity. Endogenous expressions of ANXA1 and FPR1 were observed in uterine tissues and MCs, but absent for FPR2. Modulations of MCs and ANXA1 protein expression and the specificity of FPR1 receptor immunolabeling in the clinical-pathological variables of the investigated uterine lesions indicate the involvement of these cells and the interaction ANXA1/FPR1 in the development of inflammation and uterine neoplasia.

Key words: neoplasias, mast cells, annexin A1, formyl peptide receptors, tumor biomarkers, therapeutic targets.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da interação entre os MCs e as células do microambiente tumoral	17
Figura 2. Estrutura da proteína Anexina A1	20
Figura 3. Análise de quantificação dos MCs.....	28
Figura 4. Imunofluorescência para as proteases triptase (verde) e quimase (vermelho) dos MCs	30
Figura 5. Expressão endógena da ANXA1 e do receptor FPR1 nas lesões de endométrio	31
Figura 6. Expressão endógena da ANXA1 e do receptor FPR1 nas lesões de miométrio	32
Figura 7. Expressão endógena da ANXA1 e do receptor FPR1 nos MCs	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
mm ²	Milímetros quadrados
µm	Micrômetro
Ac2-26	Peptídeo mimético Ac2-26 da proteína anexina
ADC	Adenocarcinoma
ANOVA	Análise de variância
ANXA1	Anexina A1
<i>ANXA 1</i>	Gene da Anexina A1
BSA	Albumina bovina
CE	Câncer de endométrio
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
cPLA2	Fosfolipase A ₂ citosólica
DAB	Diaminobenzina
D.O.M	Densidade óptica média
FITC	Fluorescein isothiacyanate (isotiacionato de fluoresína)
FPR	Receptores para peptídeos formilados
GCs	Glicocorticóides
HC	Hiperplasia complexa sem atipia
HCA	Hiperplasia complexa atípica
HEA	Hiperplasia endometrial simples atípica
HES	Hiperplasia endometrial simples sem atipia
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8

kDa	Kilodalton
MCs	Mastócitos
MCi	Mastócito intacto
MCd	Mastócito desgranulado
MC _C	Mastócito quimase positivo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MC _T	Mastócito triptase positivo
MC _{TC}	Mastócito triptase e quimase positivo
MMPs	Metaloproteinases de matriz
n	Número de amostra
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Valor de p (significância do teste estatístico)
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBS-T	Tampão fosfato de sódio com Triton X-100
SCF	Stem cell fator
S.E.M	Standarr error of mean (erro padrão de média)
SKCO	Linhagem celular derivada de ADC colorretal
TNF- α	Tumor necrosis factor- α (Fator de necrose tumoral- α)
TGF- β	Fator de transformação de crescimento β
TR	Texas red
vs.	Versus

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	15
1.1. Mastócitos	16
1.2. Anexina A1 e FPR	19
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos Gerais	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. Obtenção das biópsias de variáveis clínico-patológicas das lesões uterinas	24
3.2. Análise e quantificação dos mastócitos	24
3.3. Imunofluorescência e análise da heterogeneidade dos mastócitos	25
3.4. Análises Imuno-histoquímicas.....	25
3.5. Análises Estatísticas.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Quantificação dos mastócitos	27
4.2. Heterogeneidade dos mastócitos.....	29
4.3. Expressão da proteína ANXA1 e receptores em lesões uterinas	30
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS Cópia do certificado de aprovação no CEP	49
APÊNDICA A “Anexina A1 e metaloproteinases de matriz em neoplasias uterinas”.....	50

I. INTRODUÇÃO

O câncer de endométrio (CE) é um dos tumores ginecológicos malignos mais comuns em países industrializados e sua incidência vem aumentando nas últimas décadas (SIEGEL *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2016; SIEGEL, MILLER E JEMAL, 2017). A idade média de diagnóstico é por volta dos sessenta anos, sendo que 20 a 25% dos casos são diagnosticados na pré-menopausa (SIEGEL *et al.*, 2012). Entre os fatores de risco associados ao desenvolvimento desses tumores estão obesidade, anovulação, nuliparidade e menopausa (GU, CHEN E ZHAO, 2013). O diagnóstico do CE é normalmente feito durante a avaliação de hemorragia vaginal anormal, peri ou pós-menopausa, sendo que 75 % dos tumores de endométrio são diagnosticados numa fase precoce (MATIAS-GUIU E PRAT, 2013).

Após a menopausa, os ovários e as glândulas adrenais continuam a produzir o hormônio androstenodiona, que é convertido em estrona no tecido adiposo pela enzima aromatase. Esse estrógeno fraco pode estimular a proliferação endometrial crônica e levar ao desenvolvimento do carcinoma após a menopausa (KAAKS *et al.*, 2002). Os tumores originados em ambiente hiper-estrogênico são classificados em adenocarcinoma (ADC) endometrial do tipo I, sendo os cânceres mais comuns e tendo como precursores a hiperplasia endometrial (SANDERSON *et al.*, 2016). Esses tumores caracterizam-se por histologia endometriode de baixo grau e são receptores de estrógeno e progesterona positivos.

A cirurgia é o tratamento padrão, sendo a radioterapia adjuvante indicada para pacientes que têm alto risco de recorrência da doença (GU, CHEN E ZHAO, 2013), condição que estimula o estudo de determinantes prognósticos que possam fornecer informações mais precisas sobre as pacientes que estão em risco de progressão ou recorrência da doença (PANSRIKAEW *et al.*, 2010).

A hiperplasia endometrial é uma patologia uterina que apresenta alterações morfológicas no endométrio, caracterizada pelo aumento da proliferação glandular em relação ao estroma quando comparado com o endométrio normal, associada também com a estimulação excessiva do estrógeno. (SANDERSON *et al.*, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a hiperplasia endometrial é classificada em quatro categorias: hiperplasia endometrial simples sem atipia (HES), hiperplasia endometrial simples com atipia (HEA), hiperplasia complexa sem atipia (HC) e hiperplasia complexa com atipia citológica (HCA). As mulheres que desenvolvem hiperplasias endometriais, em sua maioria,

apresentam clinicamente sangramento uterino anormal, sendo a hemorragia pós-menopausa estimada em 15% dos casos (SANDERSON *et al.*, 2016). Os fatores de risco para o desenvolvimento dessa lesão são semelhantes aos do CE (BOYRAZ *et al.*, 2016; SANDERSON *et al.*, 2016).

Dentre as lesões uterinas estrógeno dependentes, encontra-se também a adenomiose, caracterizada como inflamação, cujas células endometriais glandulares e estromais estão presentes no interior do miométrio, causando sangramento uterino anormal e dismenorréia (PONTIS *et al.*, 2016; YE *et al.*, 2016). As células musculares lisas da região do miométrio rodeiam os ninhos de adenomiose tornando-se hipertróficas, levando a contrações anormais da parede uterina (SEIKKULA, NIINIMÄKI E SUVITIE, 2016).

Outra neoplasia comum do trato reprodutivo feminino é o leiomioma uterino, ou fibroma, que afeta 40% das mulheres em idade reprodutiva com aumento da incidência para 70 a 80% aos 50 anos de idade (BAIRD *et al.*, 2003). Os leiomiomas apresentam como sintomas pressão e dor pélvica, sangramento uterino anormal e disfunção reprodutiva incluindo a redução da fertilidade ou complicações na gravidez (CORONADO *et al.*, 2000; BORAH *et al.*, 2013; NEZHAT *et al.*, 2016). Ainda, os leiomiomas uterinos são causas frequentes de histerectomia (FARQUHAR E STEINER, 2002; OKOGBO *et al.*, 2011; LAGANÀ *et al.*, 2016).

Várias investigações indicam que o microambiente tumoral é crucial na evolução do câncer, caracterizando-se principalmente pela composição alterada da matriz extracelular, alta densidade de microvasos e abundância de células inflamatórias, como mastócitos (MCs) (GRIVENNIKOV, GRETEN E KARIN, 2010; PANSRIKAEW *et al.*, 2010; SIMIONESCU *et al.*, 2013).

1.1. Mastócitos

Os fatores que parecem desempenhar papéis importantes no comportamento de vários tipos celulares dentro de um tumor incluem o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8/CXCL8, proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1, fator de transformação do crescimento (TGF)- β e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (GRIVENNIKOV, GRETEN E KARIN, 2010; SANSONE E BROMBERG, 2011). A maioria destes fatores são produzidos pelas células tumorais e inflamatórias, promovendo a comunicação parácrina e autócrina no microambiente tumoral e influenciando todos os estágios do desenvolvimento tumoral, incluindo a iniciação, promoção, progressão e metástase (AGGARWAL,

VIJAYALEKSHMI E SUNG, 2009; GRIVENNIKOV E KARIN, 2011; NEURATH E FINOTTO, 2011). A expressão de vários mediadores inflamatórios, assim como a abundância e o estado de ativação dos diferentes tipos celulares no microambiente tumoral ditam se a inflamação terá um papel pró ou anti-tumoral (GRIVENNIKOV, GRETEN E KARIN, 2010; SANSONE E BROMBERG, 2011).

Os MCs são as primeiras células que reconhecem os sinais da iniciação tumoral, em resposta ao *stem cell factor* (SCF) das células tumorais (KHAZAIE *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013). No processo de desgranulação os MCs liberam fatores quimiotáticos e proteases como triptase e quimase para o meio extracelular, contribuindo na degradação da matriz extracelular, promoção da angiogênese, invasão tumoral e remodelação tecidual por meio de proteólises seletivas na matriz e ativação de metaloproteinases (MMPs) (CONTI *et al.*, 2007; STROUCH *et al.*, 2010; GASTARDELO *et al.*, 2014; AMMENDOLA *et al.*, 2016) (Figura 1).

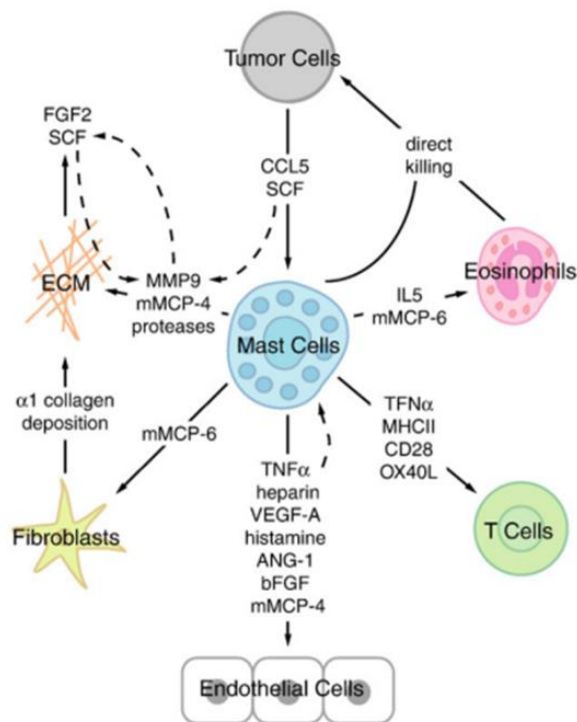


Figura 1. Representação esquemática da interação entre os MCs e as células do microambiente tumoral.

No desenvolvimento tumoral as células secretam moléculas promovendo o recrutamento dos MCs. Dentro do microambiente tumoral, os MCs liberam uma variedade de mediadores afetando a sobrevivências das células tumorais, bem como a remodelação de tecidos locais e recrutamento de células efetoras imunitárias. Células locais e populações que se infiltram, também produzem e secretam seus subconjuntos de moléculas, criando um conjunto complexo de interações (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009).

A expressão variável das enzimas triptase, quimase e catepsina G, tem levado ao reconhecimento de diferentes subpopulações de MCs humanos. MCs que expressam triptase e quimase (MC_{TC}) são abundantes no tecido conjuntivo da pele (derme), submucosa do trato gastrointestinal, parênquima mamário, miocárdio, linfonodos, conjuntiva e sinóvia. Enquanto, aqueles que expressam somente triptase (MC_T) são localizados geralmente, na mucosa dos tratos respiratório e gastrointestinal (METCALFE E SCHWARTZ, 2009; KHAZAIE *et al.*, 2011; DE SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015; ANDERSSON *et al.*, 2016). A terceira e menor população de MCs, expressa somente quimase e catepsina G (MC_C) (METCALFE E SCHWARTZ, 2009; SWEDENBORG, MÄYRÄNPÄÄ E KOVANEN, 2011). Alguns estudos têm mostrado que tais classificações não são rígidas, podendo ser modificadas dentro do microambiente tumoral (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009; AMMENDOLA *et al.*, 2014; DE SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015).

Jeziorska (1995) e colaboradores observaram no útero, em condições normais, a presença dos MCs no endométrio durante todo o ciclo menstrual, sem flutuações em número ao longo do ciclo. No entanto, a maior ativação dos MCs imediatamente antes da menstruação foi identificada em outra investigação (LEE *et al.*, 2015). De modo interessante, os MCs expressam receptores de estrogênio, que quando estimulados aumenta a atividade dessas células. (THEOHARIDES E STEWART, 2015). Além disso, o estradiol também estimula na migração dos MCs para o útero e em sua desgranulação (JENSEN *et al.*, 2010; THEOHARIDES E STEWART, 2015).

Estudos relataram que, na endometriose, a análise quantitativa dos MCs mostrou aumento do número de células intactas e desgranuladas no endométrio ectópico em comparação com o eutópico normal (KEMPURAJ *et al.*, 2004; FUJIWARA *et al.*, 2004; SUGAMATA *et al.*, 2005; PAULA *et al.*, 2015). Em um trabalho realizado em modelo de endometriose, as ratas tratadas com um antagonista do receptor de leucotrieno mostraram inibição da infiltração e a ativação dos MCs nas lesões endometriais (IHARA *et al.*, 2004). Além disso, as lesões profundas de endometriose, geralmente associadas com dor pélvica exibiram número elevado de MCs ativados próximos aos nervos periféricos (ANAF *et al.*, 2006), sugerindo envolvimento destas células no desenvolvimento de fibrose, processos de adesão e a produção da dor na endometriose. Investigações indicam predominância MC_T no endométrio eutópico (JEZIORSKA, SALAMONSEN E WOOLLEY, 1995; PAULA *et al.*, 2015) e aumento significativo nas células quimase-positivas no endométrio ectópico (ANAF

et al., 2006; PAULA *et al.*, 2015), sugerindo uma mudança no padrão de subtipos de MCs associados às lesões.

Os MCs também têm sido estudados em neoplasias uterinas benignas e malignas. A redução no número dos MCs foi observada na hiperplasia atípica e no sarcoma endometrial (D'SOUZA, RAMESHKUMAR E NIRMALA, 1994), enquanto o aumento dessas células foi encontrado nos leiomiomas (ZHU, SHI E ZHOU, 2004; LÜ *et al.*, 2007). A densidade de microvasos e MCs triptase-positivos foi estudada no leiomioma e CE humanos (EROL *et al.*, 2011). Além disso, os mesmos pesquisadores relataram que o número de MCs no CE foi maior do que em leiominoma.

Outra investigação (PANSRIKAEW *et al.*, 2010) mostrou ausência de correlação significativa entre quantidade de microvasos e densidade de MCs e a recorrência de CE. Em contraste, Ribatti *et al.* (2005) observaram que a densidade de microvasos foi altamente correlacionada com o número de MCs triptase-positivos na progressão do tumor no CE. A correlação significativa entre a maior densidade MCs e invasão miometrial foi demonstrada no CE (CINEL *et al.*, 2009) sugerindo os MCs como células potenciais para tratamentos adjuvantes ou prognósticos.

Embora pesquisas anteriores tenham relatado os MCs no leiomioma (EROL *et al.*, 2011) e no CE (PANSRIKAEW *et al.*, 2010), os resultados são conflitantes, além disso, não foram realizados estudos sobre o estado de ativação dessas células, tampouco foi verificada a presença de quimase nessas condições clínicas, o que estimula as pesquisas sobre os MCs em diferentes condições neoplásicas uterinas auxiliando no entendimento do papel dessas células no evolução da neoplasia, com eventual possibilidade de aplicação clínica.

1.2. Anexina A1 e FPR

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biologia tumoral é essencial para a identificação de candidatos a marcadores prognósticos, novos alvos terapêuticos e estratégias preditivas de sobrevivência. As investigações que relacionaram a proteína Anexina A1 (ANXA1) à regulação do crescimento celular, juntamente com a sua participação na cascata de sinalização celular, têm demonstrado um alvo importante para as pesquisas relacionadas com o desenvolvimento tumoral (GUO, LIU, SUN, 2013; GASTARDELO *et al.*, 2014).

A ANXA1 é uma proteína de 37 kDa, que exhibe sítios de ligação ao cálcio e aos fosfolípidios de membrana, e está envolvida na inibição das sínteses de eicosanoides e

fosfolipase A₂ (cPLA₂), induzidas por glicocorticoides (GCs), o que confere propriedades anti-inflamatórias a essa proteína (FLOWER, 1988; PERRETTI E GAVINS, 2003; D'ACQUISTO, PERRETTI E FLOWER, 2008). Treze membros da família das anexinas foram descritos e clonados em mamíferos (PEPINSKY *et al.*, 1988; RAYNAL E POLLARD, 1994; MOSS E MORGAN, 2004; GOBBETTI E COORAY, 2016), e em humanos, o gene *ANXA1*, está localizado na região cromossômica 9q12-9q21.2 (HUEBNER *et al.*, 1988).

As anexinas são agrupadas em função das suas características estruturais, incluindo a presença de um núcleo, que é constituído por quatro repetições de 60 a 70 aminoácidos cada, com alta afinidade ao cálcio, ligado a uma sequência N-terminal, que confere especificidade de ação para cada membro da superfamília anexina (D'ACQUISTO, PERRETTI E FLOWER, 2008; BOUDHRAA *et al.*, 2016; GOBBETTI E COORAY, 2016). A representação esquemática da estrutura primária e o arranjo tridimensional da ANXA1 são mostrados na figura 2.

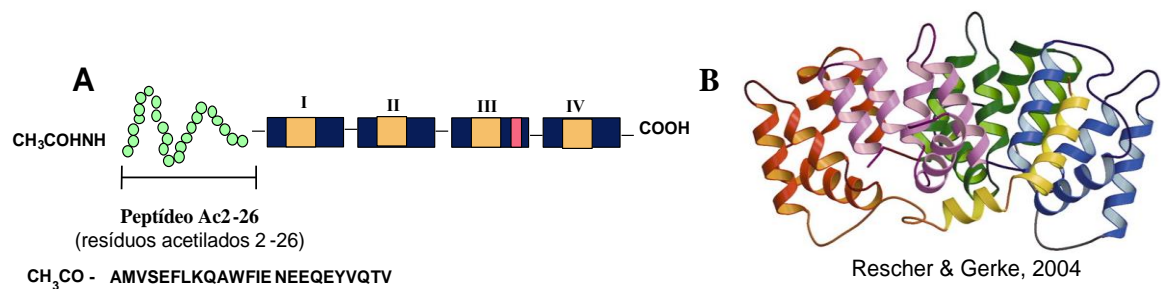


Figura 2. Estrutura da proteína Anexina A1 - (A) Representação esquemática da estrutura primária da proteína ANXA1, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26). (B) Ilustração do arranjo tridimensional dessa proteína (RESCHER E GERKE, 2004).

A ANXA1 apresenta múltiplas funções em diferentes sistemas e a expressão alterada dessa proteína tem sido associada à transformação celular, progressão tumoral e metástase (LIM E PERVAIZ, 2007; GUO, LIU, SUN, 2013; BOUDHRAA *et al.*, 2016). A proteína é amplamente distribuída no organismo e também pode ser expressa em células imunitárias diferentes, em particular os MCs e os neutrófilos (OLIANI *et al.*, 2000; OLIANI *et al.*, 2001; GIL *et al.*, 2006; GAVINS E HICKEY, 2012; SINNI AH *et al.*, 2016).

No câncer humano o padrão da expressão da ANXA1 é muito variado (LI *et al.*, 2008; GUO, LIU, SUN, 2013; BOUDHRAA *et al.*, 2016). O aumento da expressão dessa proteína foi previamente observado no ADC mamário (AHN *et al.*, 1997; YOM *et al.*, 2011), carcinoma hepatocelular (MASAKI *et al.*, 1996; GUO, LIU, SUN, 2013), câncer de pâncreas (BAI *et al.*, 2004; GUO, LIU, SUN, 2013), câncer de pulmão (GUO, LIU, SUN, 2013;

RONG *et al.*, 2014; BOUDHRAA *et al.*, 2016) e carcinoma de pênis (CALMON *et al.*, 2013). Outras investigações relataram redução da expressão da ANXA1 no câncer de cabeça e pescoço (GASTARDELO *et al.*, 2014), esôfago (PAWELETZ *et al.*, 2000; GUO, LIU, SUN, 2013), próstata (PAWELETZ *et al.*, 2000; XIN *et al.*, 2003) e mama (SHEN *et al.*, 2005; YOM *et al.*, 2011).

A alteração da expressão do ANXA1 foi estudada durante a progressão da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (WANG *et al.*, 2008). A redução da expressão da ANXA1 na NIC ocorreu em paralelo com o aumento da gravidade da neoplasia, associada com a diferenciação celular tumoral no carcinoma invasivo de células escamosas do colo do útero, sugerindo que a alteração da expressão da ANXA1 pode ser um evento precoce no desenvolvimento da neoplasia cervical. Além disso, a expressão da ANXA1 pode ser um marcador eficaz para a eventual avaliação prognóstica de NIC e para análise de diferenciação de células tumorais no carcinoma de células escamosas do colo do útero.

Outro aspecto importante na biologia da ANXA1 tem sido o estudo do seu mecanismo de ação na superfície celular. A observação que a ANXA1 e os seus peptídeos miméticos ligam-se a uma classe específica de receptores transmembrana acoplados a proteína G, os receptores para peptídeos formilados (nFPR) (WALTHER, RIEHEMANN E GERKE, 2000) revolucionou o campo de pesquisa da ANXA1. Este estudo permitiu novas investigações nas relações funcionais e moleculares entre a ANXA1 e a família de receptores FPR (D'ACQUISTO, PERRETTI E FLOWER, 2008; GOBBETTI E COORAY, 2016).

Três membros da família FPR humana foram identificados e incluem FPR1, FPR2 (também conhecido como FPR2/ALX e FPRL-1) e FPR3 (YE *et al.*, 2009; LEONI E NUSRAT, 2016). Em uma investigação, foi mostrado que a ANXA1 e seu peptídeo mimético podem promover a invasão das células SKCO-15 (linhagem celular derivada de ADC colorretal) por meio da ativação do receptor FPR2 de maneira autócrina/parácrina (BABBIN *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a ANXA1, derivada das células inflamatórias e tumorais do carcinoma epidermoide de laringe humano, pode contribuir na regulação do crescimento tumoral por meio de mecanismos parácrinos mediados pelo receptor FPR2 (GASTARDELO *et al.*, 2014).

No útero, análises imuno-histoquímicas e densitométricas indicaram expressão aumentada da ANXA1 nas glândulas epiteliais indiferenciadas das amostras ectópicas em comparação com as glândulas epiteliais diferenciadas do endométrio ectópico e glândulas endometriais eutópicas (LI *et al.*, 2008; PAULA *et al.*, 2015). Além disso, por meio de

análises imunocitoquímicas ultraestruturais (PAULA *et al.*, 2015) foi demonstrada a expressão do FPR1 nas mesmas regiões onde foi observada a expressão da ANXA1, com aumento significativo do receptor FPR1 nas glândulas indiferenciadas do endométrio ectópico em comparação com glândulas eutópicas normais e ectópicas bem diferenciadas. A expressão aumentada de ANXA1 também foi observada no CE (XUE *et al.*, 2007), contudo não existem resultados da expressão de ANXA1 em leiomiomas, tampouco do receptor FPR na neoplasia uterina. Também não se conhece a expressão dessas proteínas nos MCs em tumores benignos e malignos do útero.

Poucos pesquisadores têm estudado o envolvimento da ANXA1 e sua possível interação com o receptor FPR nas lesões uterinas. Além disso, investigações mostram que o papel do MC precisa ser individualmente avaliado e estabelecido para cada tipo de câncer e, também, para diferentes fases do mesmo câncer. Por essas razões, foi avaliado o grau de ativação dos MCs e a expressão da ANXA1 e dos receptores FPR1 e FPR2 em variáveis clínico-patológicas benignas e malignas de lesões uterinas em biópsias humanas. Os resultados dessas análises poderão auxiliar no entendimento do papel das subpopulações dos MCs, e sua relação com a proteína anti-inflamatória ANXA1 e receptores nas neoplasias uterinas como possibilidade de novos marcadores prognósticos ou aplicação clínica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Analisar a heterogeneidade dos mastócitos e a expressão das proteínas ANXA1, FPR1 e FPR2 nessas células e em biópsias humanas de inflamação e neoplasias uterinas benignas e malignas.

2.2. Objetivos Específicos

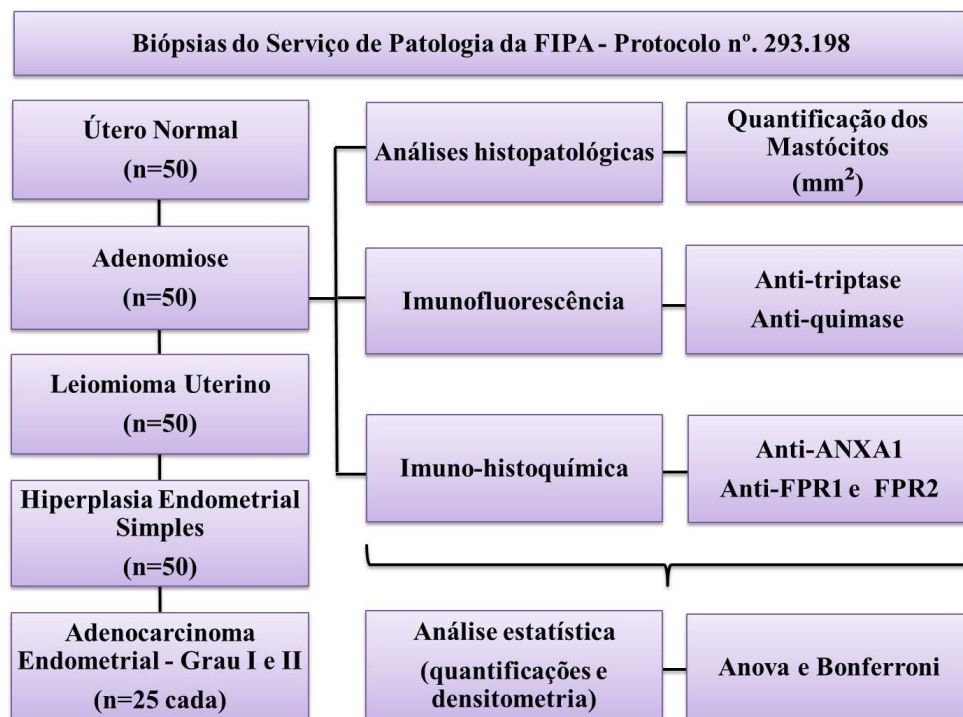
No útero normal, adenomiose, hiperplasia endometrial simples, leiomioma e ADC endometrial de graus I e II:

- Quantificar e avaliar o estado de ativação dos MCs;
- Identificar a heterogeneidade dos MCs, para triptase e quimase;
- Investigar a expressão endógena da proteína anti-inflamatória ANXA1 e dos seus receptores FPR1 e FPR2, nos tecidos e nos MCs.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção das biópsias de variáveis clínico-patológicas das lesões uterinas

As análises foram realizadas em biópsias de adenomiose, leiomiomas e HES (n=50) e ADC de endométrio de grau I (n=25) e grau II (n=25) provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia, das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA/FAMECA) de Catanduva (Protocolo CEP/FIPA no. 1.076.918). Amostras de útero normal (regiões de margem não acometidas pelas lesões dos mesmos pacientes) (n=50) foram usadas como controle. Abaixo esquema da metodologia proposta.



3.2. Análise e quantificação dos mastócitos

As biópsias das diferentes condições clínico-patológicas foram seccionadas em 4µm e os MCs quantificados com base em suas características morfológicas, como intactos (MC_i) e desgranulados (MC_d), por meio da coloração por Azul de Toluidina a 0,5 % (DA SILVA, 2011; GASTARDELO *et al.*, 2014; PAULA *et al.* 2015). A quantificação dos MCs nos fragmentos uterinos foi realizada utilizando a objetiva de 40X no microscópio *Leica* (DM500) do Laboratório Multidisciplinar das FIPA, Catanduva-SP. As áreas de cada tecido foram

obtidas com o auxílio do *software Leica Image Analysis*. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.) do número de MCs por mm².

3.3. Imunofluorescência e análise da heterogeneidade dos mastócitos

Cortes obtidos das amostras foram desparafinizados, re-hidratados e a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 a 96°C, durante 20 min. Os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos em PBS contendo 0,25% de Triton X-100, lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada). Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com os seguintes reagentes: a) soroalbumina bovina (BSA) a 2% em PBST por 30 minutos para o bloqueio de ligação inespecífica dos anticorpos; b) anticorpos *rabbit monoclonal anti-chymase* (Abcam, Cambridge, MA, USA) e *mouse monoclonal anti-tryptase* (Millipore, EUA) diluídos em BSA a 1%, por 1 hora, temperatura ambiente, em câmara úmida; d) lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); e) anticorpo secundário *goat anti-mouse-FITC* (verde) e *goat anti-rabbit-TR* (vermelho) conjugados (1:100; Santa Cruz, USA) por 60 minutos, em câmara escura e lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); f) DAPI por 1 minuto em câmara escura e lavado com PBS. Após esta reação, as lâminas foram montadas com glicerol. O controle negativo da reação foi obtido omitindo-se o anticorpo primário. A quantificação dos MCs nos tecidos uterinos foi realizada utilizando a objetiva de 40X, com o auxílio do programa analisador de imagem *Axiovision* do Microscópio AXIOSKOP2 (ZEISS, Germany), do Laboratório de Morfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. do número de MCs por mm².

3.4. Análises Imuno-histoquímicas

As expressões das proteínas ANXA1, FPR1 e FPR2 foram analisadas nos tecidos uterinos e nos MCs das biópsias selecionadas. Secções seriadas de 4µm foram preparadas em lâminas silanizadas e, em seguida: (a) desparafinizados e hidratados em água por 5 minutos; (b) incubados em calor úmido em solução tampão citrato pH 6,0, por 20 minutos, para a recuperação antigênica; (c) lavados em água destilada e deixados em solução de peróxido de hidrogênio (p.a) a 3% em metanol por 30 minutos, para o bloqueio de peroxidase endógena; (d) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (e) incubados *overnight*, em câmara úmida a 4°C, com os anticorpos primários policlonais *rabbit*: anti-ANXA1 (1:2000) (*Life Technologies, EUA*), anti-FPR1 (1:1000) e anti-FPR2 (1:2000) (*Bioss,*

EUA), diluídos em BSA a 1%; (f) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (g) incubados com o anticorpo secundário biotilado (*kit Histostain, Invitrogen, EUA*) por 30 minutos; (h) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (i) imersos em complexo estreptavidina peroxidase conjugada por 30 minutos; (j) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (k) incubados em substrato diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos a 37° C, no escuro, para revelação (*Kit DAB, Invitrogen, EUA*); (l) lavados em água destilada, contracorados com Hematoxilina e as lâminas montadas. A análise da expressão das proteínas ANXA1, FPR1 e FPR2 foi realizada nas células epiteliais glandulares e nas células musculares lisas das variáveis analisadas, por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) pelo programa analisador de imagem *Leica Image Analysis* e a densidade óptica média (D.O.M.) mostrou a intensidade de imunomarcacão apenas nas áreas imunorreativas (GIROL *et al.*, 2013).

3.5. Análises Estatísticas

Os dados das análises quantitativas e densitométricas foram obtidos como média \pm S.E.M., submetidos à análise de normalidade e comparados pela ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação dos mastócitos

Após a seleção das biópsias, os mastócitos intactos (MC_i) e desgranulados (MC_d) foram quantificados em secções de útero normal, adenomiose, HES, leiomiomas e ADC endometrial de graus I e II, por meio da coloração de Azul de Toluidina (Figura 3).

Nas análises dos tecidos uterinos normais foi verificada grande quantidade de MC_i, contendo grânulos citoplasmáticos metacromáticos, no endométrio ($25,95 \pm 0,7133$) e no miométrio normais ($39,69 \pm 1,118$) (Figura 3A, E, I e J).

No endométrio, numerosos MC_i também foram observados nas regiões peritumorais de ADC de grau I ($32,90 \pm 0,6057$) e II ($28,13 \pm 0,2483$) e tumorais dos ADCs endometriais de graus I ($28,46 \pm 0,7083$) e II ($22,19 \pm 0,2378$) (Figura 3C, D e I). Aumento significativo de MC_i ocorreu na HES ($43,75 \pm 2,011$) comparado aos demais grupos (Figura 3B e I), e na margem peritumoral de ADC de grau I com relação ao endométrio normal (Figura 3I). Com relação aos MC_d, maior número de células nessa condição foi observado na região peritumoral do ADC endometrial de grau II ($13,00 \pm 0,7013$), enquanto no interior deste tumor ocorreu redução da quantidade de MC_d ($4,313 \pm 0,01306$) comparada às margens normais ($8,500 \pm 0,6124$) (Figura 3D e I).

Com relação às quantificações realizadas no miométrio, vários MC_i foram encontrados na margem peritumoral do leiomioma e aumento do número de MC_i foi observado na adenomiose ($50,30 \pm 1,883$) comparado ao miométrio normal ($11,88 \pm 1,099$) (Figura 3F, G e J). Diferentemente, no leiomioma, ocorreu diminuição significativa dos MCs tanto intactos ($p < 0,001$) (MC_i: $10,31 \pm 1,351$) como desgranulados ($p < 0,001$) (MC_d: $3,775 \pm 0,5197$) (Figura 3H e J).

Em todas as condições clínicas, com exceção do leiomioma, a quantidade de MC_i foi significativamente maior ($p < 0,001$) comparada aos desgranulados (Figura 3I e J).

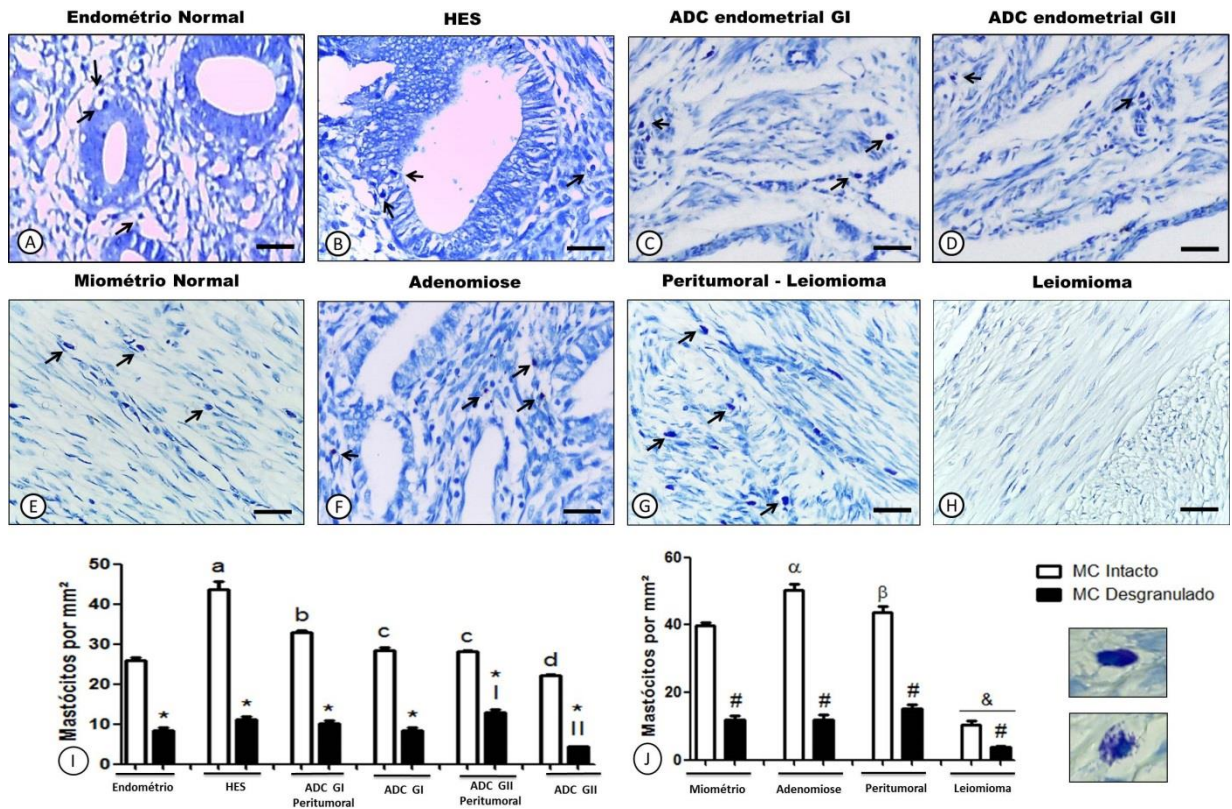


Figura 3. Análise de quantificação dos MCs. Vários MCs (setas) no endométrio e miométrio uterino em condições normais, na HES, na adeniose, nas regiões peritumorais do leiomioma e dos ADCs endometriais de graus I e II (A, B, D, E, F e G). Ausência dos MCs no Leiomioma (H). Cortes de 4µm. Coloração: Azul de Toluidina. Barras: 10µm. **Quantificação dos MCs (I e J).** a p<0,001 vs MCi endométrio normal; b p<0,001 vs MCi endométrio normal e HES; c p<0,001 vs MCi HES e p<0,01 vs MCi ADC GI peritumoral; d p<0,001 vs MCi HES, ADC peritumoral GI, ADC GI e ADC GII peritumoral; I p<0,01 vs MCd endométrio normal e ADC GI; II p<0,05 vs MCd endométrio normal, HES, ADC GI peritumoral, ADC GI e ADC GII peritumoral; * p<0,001 vs MCi; α p<0,001 vs MCi miométrio normal; β p<0,05 vs MCi adeniose; & p<0,001 vs MCi e MCd miométrio, adeniose e margem peritumoral e # p<0,001 vs MCi.

4.2. Heterogeneidade dos mastócitos

A heterogeneidade dos MCs foi verificada para as proteases triptase e quimase, por meio do método de imunofluorescência, nas HES, nos ADC endometrial de graus I e II, na adenomiose e no leiomioma, comparados aos tecidos uterinos normais.

As análises das lesões uterinas mostraram muitos MCs triptase (MC_T) e quimase-positivos (MC_C) em todas as condições clínicas estudadas, exceto no leiomioma (Figura 4). As células foram localizadas em grande quantidade no endométrio e principalmente no miométrio (Figura 4H e I). As quantificações dos MCs evidenciaram elevado número de MC_T em comparação a MC_C nas margens peritumorais de ADCs endometriais de grau I (MC_T : $45,60 \pm 0,8796$) e II (MC_T : $41,22 \pm 1,681$) e especialmente na adenomiose (MC_T : $122,3 \pm 6,873$).

Apesar dos MCs expressarem tanto triptase como quimase, entre os grupos, ocorreu redução dos MC_C na região peritumoral do ADC de grau II (MC_C : $25,20 \pm 1,659$) e dos MC_T e MC_C no ADC endometrial de grau II (MC_T : $32,60 \pm 3,533$; MC_C : $24,48 \pm 1,261$) comparado ao endométrio normal (MC_T : $47,17 \pm 2,313$; MC_C : $39,00 \pm 3,304$) e HES (MC_T : $53,70 \pm 3,459$; MC_C : $40,50 \pm 6,284$) (Figura 4D e H). Número significativamente menor de MC_C foi observado na adenomiose (MC_C : $47,55 \pm 6,646$) com relação ao miométrio normal (MC_C : $104,4 \pm 7,460$) e região peritumoral do leiomioma (MC_C : $6,588 \pm 0,8554$). Poucos MCs tanto triptase como quimase positivos foram encontrados no leiomioma (MC_T : $11,05 \pm 1,715$; MC_C : $6,588 \pm 0,8554$) (Figura 4G e I). Não houve diferença significativa em relação a essas duas subpopulações de células nas demais variáveis clínico-patológicas.

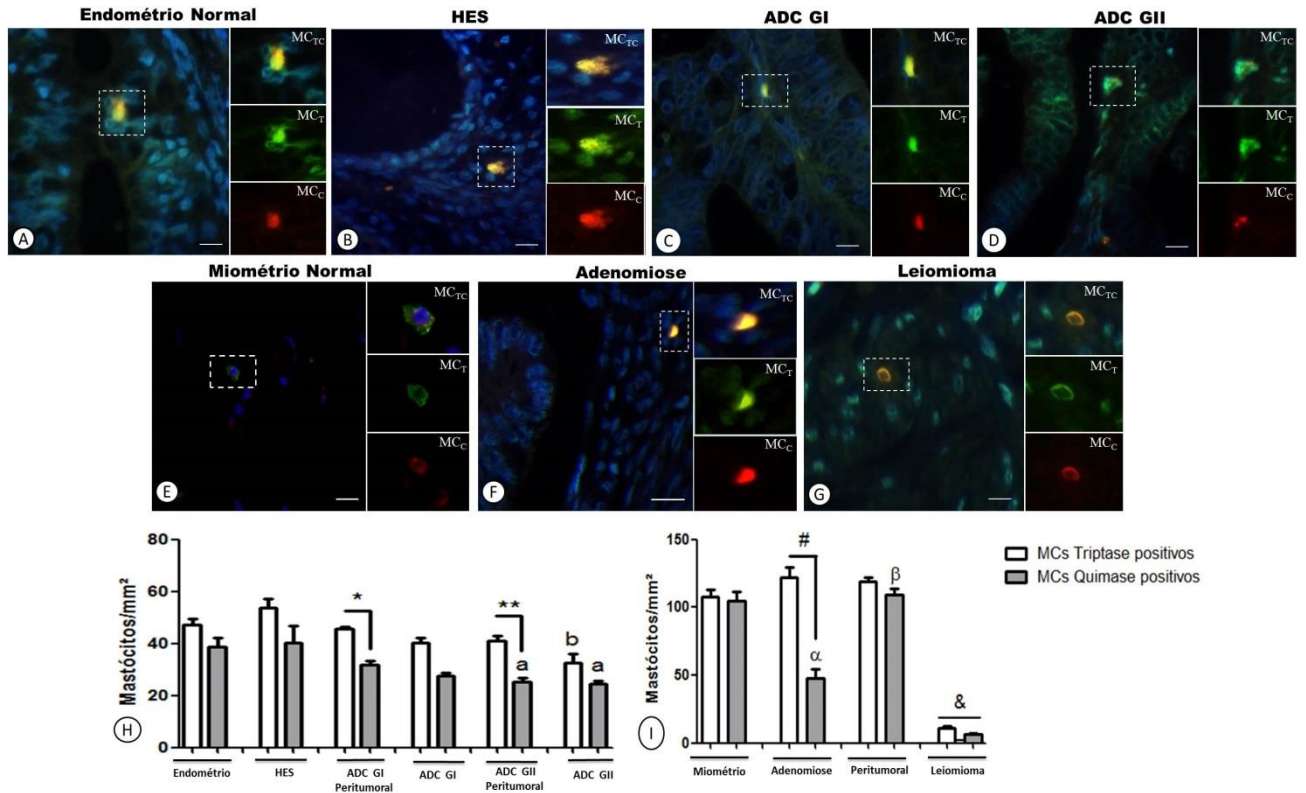


Figura 4. Imunofluorescência para as proteases triptase (verde) e quimase (vermelho) dos MCs. Célula com dupla marcação para triptase e quimase (A, B, C, D, E, F e G). No detalhe a dupla marcação (T/C), expressão para triptase (T) e quimase (C). Cortes de 4 μ m. Coloração de núcleo com DAPI. Barra: 100 μ m. Quantificação dos MCs (H e I). a $p < 0.05$ vs MC_C endométrio e HES; b $p < 0.05$ vs MC_T endométrio e HES; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs MC_T; α $p < 0,001$ vs MC_C miométrio; β $p < 0,001$ vs MC_C adeniose; & $p < 0,001$ vs MC_T e MC_C miométrio, adeniose e margem peritumoral e # $p < 0,001$ vs MC_T.

4.3. Expressão da proteína ANXA1 e receptores em lesões uterinas

A expressão endógena da proteína ANXA1 e dos seus receptores FPR1 e FPR2 nos tecidos e nos MCs, foi verificada por meio do método imuno-histoquímico, nas células epiteliais glandulares na HES, no ADC endometrial, na adeniose e no leiomioma comparados ao tecido uterino normal. A especificidade da imunomarcção foi comprovada pelos controles das reações (Figura 5E) (Figura 6D).

As análises imuno-histoquímicas das lesões uterinas mostraram expressões da ANXA1 e do FPR1 em todas as condições clínicas estudadas (Figura 5 e 6). De maneira interessante, não houve expressão para o FPR2 em nenhum dos grupos (Figura 5J e Figura 6H). Com relação à ANXA1 (Figura 5K e 6I), as observações densitométricas revelaram aumento da proteína na HES e no ADC endometrial de graus I e II ($p < 0,001$) (Figura 5C, D e

K) comparado ao endométrio controle (Figura 5A e K). Também foi observada maior expressão da proteína nos ADC endometrial de graus I ($p<0,001$) e II ($p<0,001$) com relação à HES. Ainda, a expressão aumentada da ANXA1 ocorreu na adenomiose e no leiomioma ($p<0,001$) (Figura 6B, C e I) com relação ao miométrio normal (Figura 6A e I), bem como no leiomioma quando comparado com a adenomioses ($p<0,05$).

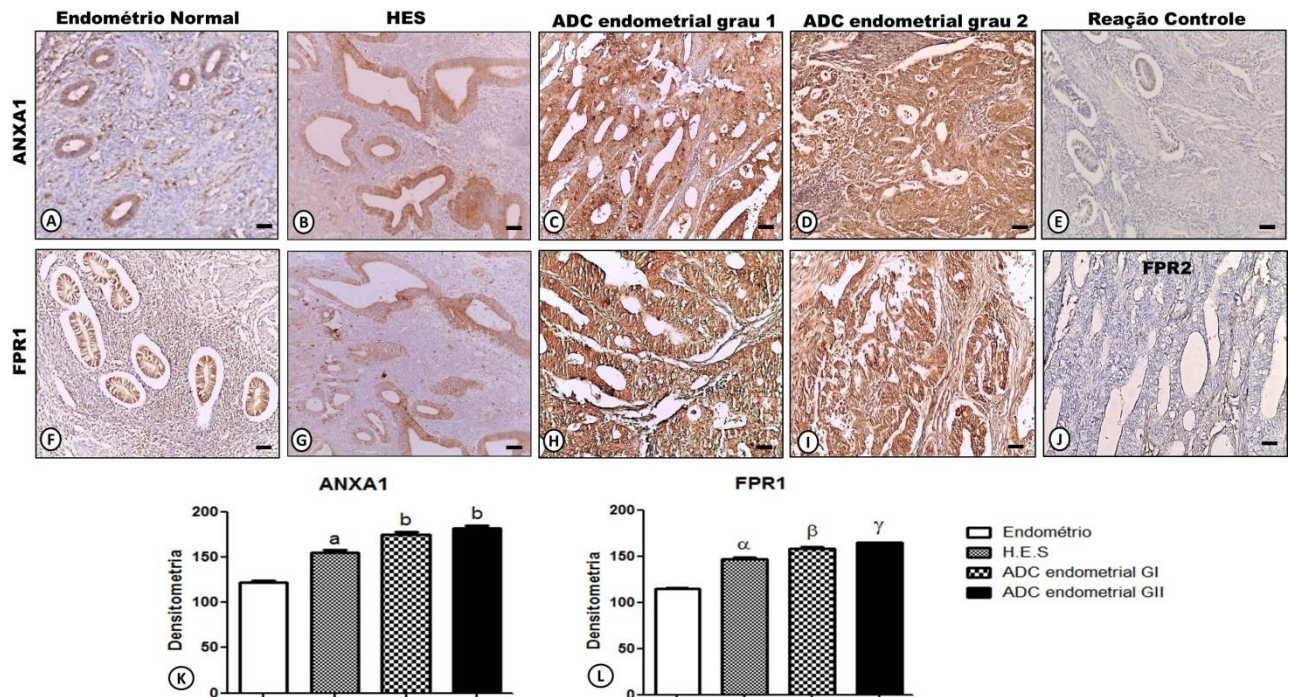


Figura 5. Expressão endógena da ANXA1 e do receptor FPR1 nas lesões de endométrio. Aumento da imunorreatividade de ANXA1 e FPR1 na hiperplasia endometrial simples (B, C e D) e nos adenocarcinomas endometriais de graus I e II (G, H e I) comparado ao endométrio normal (A, F). Ausência de imunorretividade no controle de reação (E) e para FPR2 (J). Secções: 4 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina. Barra: 10 μ m. Densitometria da imunorreatividade da ANXA1 (K) e FPR1 (L). a $p<0,001$ vs endométrio normal; b $p<0,01$ vs endométrio normal e HES; α $p<0,01$ vs endométrio normal; β $p<0,01$ vs endométrio normal e HES e γ $p<0,001$ vs e endométrio normal, HES e $p<0,01$ vs ADC endometrial de grau I.

Similarmente, foi observado aumento na imunorretividade para o FPR1 na HES ($p<0,001$), no ADC endometrial de graus I e II ($p<0,001$) (Figura 5G, H, I e L), na adenomiose ($p<0,001$) e no leiomioma ($p<0,001$) (Figura 6F, G e J), comparado aos respectivos tecidos normais (Figura 5F e L) (Figura 6E e J). No ADC de grau II a expressão do FPR1 é ainda mais acentuada ($p<0,01$) comparada ao ADC de grau I. Também no leiomioma a imunorreatividade é maior em comparação com a adenomiose ($p<0,001$).

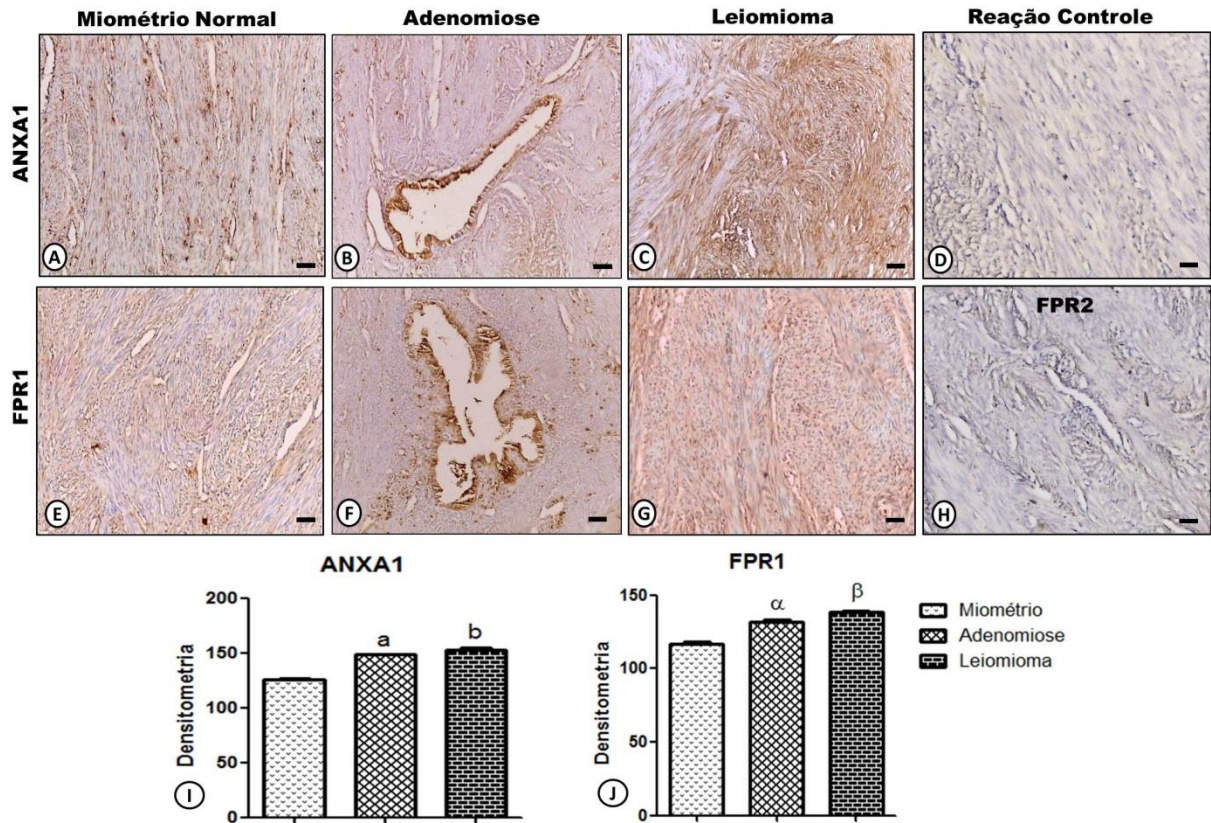


Figura 6. Expressão endógena da ANXA1 e do receptor FPR1 nas lesões de miométrio. Aumento da expressão de ANXA1 e FPR1 na adenomioses (B, F) e no leiomioma (C, G) em relação ao miométrio normal (A, E). Ausência de imunorretividade no controle de reação (D) e para FPR2 (H). Secções: 4 μ m. Contracoloração: Hematoxilina. Barra: 10 μ m. Densitometria da imunorreatividade da ANXA1 (I) e FPR1 (J). a $p < 0,001$ vs miométrio normal; b $p < 0,001$ vs miométrio normal e $p < 0,05$ vs adenomiose; α $p < 0,001$ vs miométrio normal e β $p < 0,001$ vs miométrio normal e adenomiose.

Os MCs também demonstraram imunomarcção positiva para ANXA1 e FPR1 em todas as variáveis clínico-patológicas estudadas (Figura 7A-D). A imunorreatividade para os MCs foi aumentada conforme a evolução da malignidade das lesões, especialmente com relação ao ADC endometrial de grau II (Figura 7A e B). Contudo, ocorreu aumento da expressão da ANXA1 nos MCs na adenomiose quando comparado com o leiomioma ($p < 0,05$) (Figura 7C).

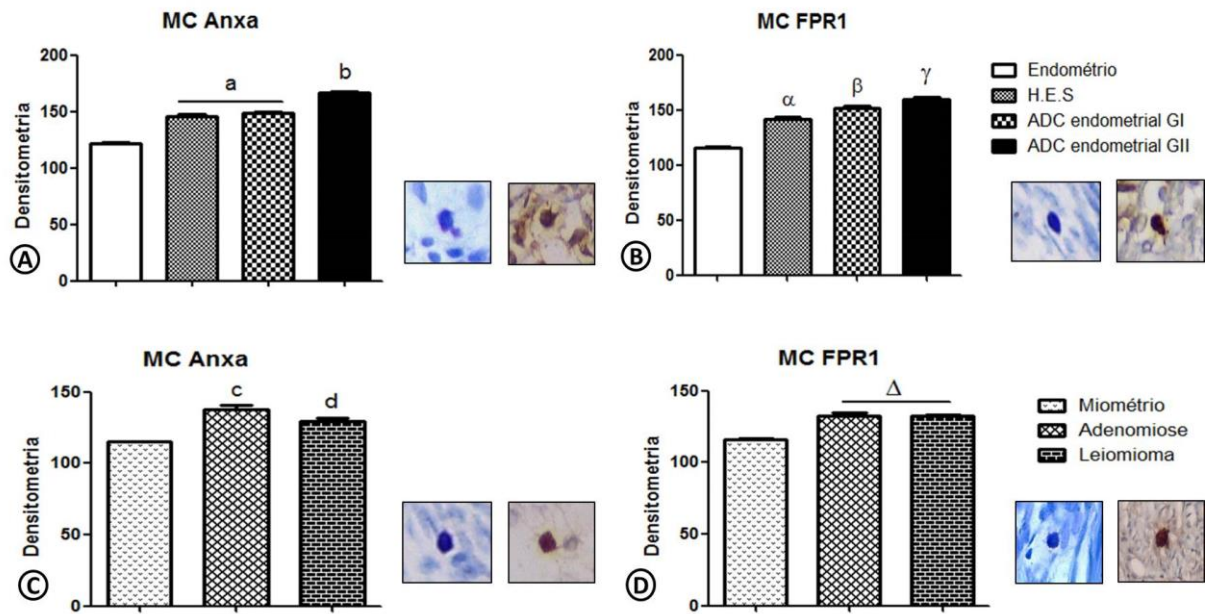


Figura 7. Expressão endógena da ANXA1 e do receptor FPR1 nos MCs. Nos detalhes a imunomarcção para ANXA1 (A, C) e FPR1 (B, D) nos MCs. Como controle de especificidade da imunorreção, o mesmo MC foi corado em azul de toluidina em corte sequencial (A-D). Densitometria da imunomarcção da ANXA1 e FPR1. a $p < 0,001$ e vs endométrio normal; b $p < 0,001$ vs endométrio normal e HES; α $p < 0,001$ vs endométrio normal; β $p < 0,001$ vs endométrio normal e HES; γ $p < 0,001$ vs endométrio normal e HES e $p < 0,01$ vs ADC endometrial de grau I; c $p < 0,001$ vs miométrio normal e d $p < 0,001$ vs miométrio normal e $p < 0,05$ vs adenomyose; Δ $p < 0,001$ vs miométrio normal.

5. DISCUSSÃO

As lesões uterinas acometem diversas mulheres nas idades reprodutivas ou na fase de menopausa no Brasil e no mundo, dentre elas, o câncer de endométrio (CE) e o leiomioma, que representam, respectivamente, os tumores malignos e benignos mais comuns (OKOGBO *et al.*, 2011; SIEGEL *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; NEZHAT *et al.*, 2016; SIEGEL, MILLER E JEMAL, 2017). O estudo das interações entre o tumor e os componentes celulares e moleculares envolvidos na tumorigênese poderá originar novos alvos biológicos na intervenção terapêutica das lesões uterinas. Devido ao envolvimento dos MCs (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009; DE SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015), da proteína ANXA1 e receptor FPR (GUO, LIU, SUN, 2013; BOUDHRAA *et al.*, 2016) no desenvolvimento tumoral, no presente estudo, analisamos essas células e proteínas em biópsias de hiperplasia endometrial simples (HES), adenomiose, leiomioma e adenocarcinoma (ADC) endometrial de graus I e II, comparadas aos tecidos normais.

Inicialmente, verificamos os MCs de acordo com suas características morfológicas, em intactos e desgranulados, e nossas análises quantitativas revelaram elevado número de MCs, em sua maioria intactos, nos tecidos controles, na HES, na adenomioses, nas regiões peritumorais dos leiomiomas e ADC endometrial de ambos os graus. Além disso, os MCs desgranulados foram observados na região peritumoral do ADC de grau II com diminuição da quantidade de MCd no interior desse tumor, comparado com endométrio normal. Essas células foram geralmente, localizadas próximos às glândulas e aos vasos sanguíneos e podem estar envolvidas com a progressão tumoral. Outros pesquisadores também relataram aumento do número de MCs tanto intactos como desgranulados na endometriose, em comparação com endométrio controle (SUGAMATA *et al.*, 2005; PAULA *et al.*, 2015). Dados da literatura indicam associação dos MCs com a vasculatura nas regiões saudáveis circundantes aos tecidos malignos, indicando o papel pró-angiogênico dessas células (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009; DE SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015).

Diferentemente, as regiões de leiomioma analisadas na nossa investigação mostraram redução significativa dos MCs intactos e desgranulados em seu interior. Vários estudos mostraram maior densidade de MCs predominantemente na periferia tumoral, na interface com tecidos saudáveis, e não no interior do tumor (COUSSENS *et al.*, 1999; SAWATSUBASHI *et al.*, 2000; SOUCEK *et al.*, 2007). A localização periférica dos MCs sugere origem por migração celular dos tecidos adjacentes ou recrutamento de progenitores

sanguíneos de vasos próximos ao tumor, ou ainda, de ambas as fontes (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009).

Investigações mostraram que as células mielóides imaturas recrutadas para o desenvolvimento de tumores expressam CD34, CCR1, MMP2 e MMP9 (KITAMURA et al., 2007), todos os quais estão presentes nos MCs em diferentes fases de desenvolvimento (DREW et al., 2002; JUREMALM et al., 2005) e indicam os MCs como células de suporte na tumorigênese (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009; DYDUCH, KACZMARCZYK E OKOŃ, 2012; AMMENDOLA et al., 2016).

Além disso, Maltby (2009) e colaboradores sugerem que a escassez de MCs no interior do núcleo tumoral pode estar associada à desgranulação dessas células levando a "fantasmas" após a coloração (GASTARDELO *et al.*, 2014). Contudo, a ausência de MCs no interior da massa tumoral pode ter outro significado. Um estudo com camundongos transgênicos mostrou que os MCs desempenham função importante como interruptor angiogênico durante o crescimento do tumor (COUSSENS *et al.*, 1999; JUNANKAR *et al.*, 2006). Nestes estudos, nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral, os MCs foram observados aumentados, próximos a vasos sanguíneos e conduzindo a angiogênese, mas foram ausentes no interior do tumor, nas fases posteriores, as células tumorais assumiram o controle do crescimento e angiogênese, e o tumor se desenvolveu independente dos MCs.

Embora esteja claro que os MCs se acumulam ao redor de muitos tipos de tumores, há relatos conflitantes sobre o valor prognóstico do número dessas células avaliadas em biópsias de tumores e a sobrevida do paciente (GULUBOVA, VLAYKOVA, 2009). Na maioria dos tumores humanos, maior número de MCs foi associado ao aumento na vascularização, e diminuição na sobrevida do paciente (CRIVELLATO, NICO, RIBATTI, 2008). Contudo, no CE, foi observada a ausência de correlação entre a densidade de MCs e a quantidade de microvasos e recorrência (PANSRIKAEW *et al.*, 2010).

A associação de infiltração de MCs com prognóstico pobre depende do tipo de câncer estudado (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009). Investigações em carcinoma de mama invasivo mostraram correlação entre a grande quantidade de MCs e melhor prognóstico (DABIRI *et al.*, 2004). Outro estudo com câncer de pulmão de células não-pequenas também demonstrou uma correlação entre a melhoria do prognóstico e a presença de MCs em ilhotas, mas não no estroma circundante (WELSH *et al.*, 2005). Estas pesquisas sugerem um papel anti-tumoral para os MCs, indicando que, em certos ambientes de tumor, as funções anti-

tumorais podem substituir o papel de promotor de tumor e enfatizam a complexidade dos MCs no ambiente tumoral (MALTBY, KHAZAIE E MCNAGNY, 2009).

Os mastócitos também produzem potentes mediadores biologicamente ativos, como histamina, TNF- α , IL-10 e as proteases triptase e quimase, o que contribui na promoção da angiogênese e invasão tumoral (STROUCH *et al.*, 2010; GASTARDELO *et al.*, 2014; PAULA *et al.*, 2015; DE SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015). Em decorrência disso, verificamos a heterogeneidade dos MCs por meio da quantificação das proteases triptase e quimase nas variáveis clínico-patológicas estudadas.

Os MC_T e MC_C foram localizados em grande quantidade nos tecidos normais, nas HES, nas regiões peritumorais e no ADC de graus I e II, nas adenomioses e margens peritumorais dos leiomiomas, com diminuição acentuada dessas células no interior do leiomioma. As análises quantitativas dos MCs demonstraram nas adenomioses e nas margens peritumorais dos ADCs endometriais de ambos os graus, predomínio da subpopulação de MC_T em relação aos MC_C. Por outro lado, a quantificação dos MCs nas demais variáveis clínico-patológicas não mostraram diferenças significantes entre MC_T e MC_C. Esses resultados apontam o maior envolvimento da triptase na inflamação e ADC e de ambas as proteases na HES e leiomioma.

Diferenças na subpopulação de MCs também foram encontradas por outros pesquisadores que observaram alta densidade de MCs triptase positivos em pólipos endometriais, comparado ao endométrio normal (AL-JEFOUT *et al.*, 2009), o que indica a participação do MC na biologia do pólipo, atuando possivelmente na iniciação, crescimento e manutenção dessa lesão (RIBATTI *et al.*, 2005; EL-HAMARNEH *et al.*, 2013). Por outro lado, Paula e colaboradores (2015) verificaram aumento dos MC_C em relação à endometriose, demonstrando mudança do subtipo de MCs quando comparados com o endométrio glandular normal.

Outros estudos também observaram MCs triptase-positivos no leiomioma e CE humanos (ZHU *et al.*, 2007; EROL *et al.*, 2011). O aumento na angiogênese foi observado no CE de alto grau, contudo a densidade dos MC triptase-positivos não aumentou com o grau histológico (EROL *et al.*, 2011). Além disso, esses mesmos autores, observaram que em leiomioma, a densidade dos MCs e a densidade dos microvasos não diferem do controle. Em contraste, Zhu *et al.* (2007) observaram predomínio de MC_{TC} no leiomioma comum e no subtipo leiomioma celular, enquanto os MT_T foram raramente observados. Contudo, quando os subtipos de MCs foram comparados nas regiões peritumorais e tumorais, ocorreu

predomínio de MC_T com relação aos MC_{TC} no tumor e a situação inversa na região peritumoral e o fenótipo MC_C não foi observado.

Em outra investigação, em neoplasias bem e pouco diferenciadas de CE, foram identificados poucos macrófagos e MC_T no interior tumoral em comparação à região peritumoral, sendo associados aos processos da angiogênese e a progressão (SIMIONESCU *et al.*, 2013). Os MC_T e MC_C também foram estudados em lesões mamárias benignas e malignas, nos quais foi observado maior número de MC_T nos tumores malignos concentradas na borda tumoral, sugerindo possível envolvimento dos MCs no processo fibroso da mama (KASHIWASE *et al.*, 2004).

A expressão das proteases dos MCs varia conforme a progressão tumoral (ANTÔNIO *et al.*, 2012). Acúmulo dessas células nos tumores ocorre em resposta aos fatores quimioatrativos produzidas por essas e outras células associadas ao câncer (THEOHARIDES E COCHARANE, 2004). Na pele, foi observada expressão aumentada dessas proteases em correlação com a maturação dos MCs e a formação de vasos sanguíneos, indicando seu envolvimento direto na progressão do tumor de pele (ANTÔNIO *et al.*, 2012). Vários estudos utilizando marcador de triptase têm mostrado que os MCs estão estrategicamente localizados próximos a vasos sanguíneos, associando-se assim com a angiogênese e o mau prognóstico tumoral (AMMENDOLA *et al.*, 2014 ; DE SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015). A triptase e quimase participam na degradação de componentes da matriz extracelular, sendo que a triptase parece ser mais essencial para a neovascularização e progressão tumoral do que a quimase (FIORUCCI E ASCOLI, 2004; ANTÔNIO *et al.*, 2012; DE SOUZA JUNIOR *et al.*, 2015). Desse modo nossos dados reforçam a participação das proteases triptase e quimase na inflamação e progressão tumoral, e indicam a triptase como principal protease na adenomiose e tumorigênese no ADC endometrial, mas o envolvimento de ambas as proteases no leiomioma e HES.

Na sequência da nossa investigação, verificamos a expressão da proteína ANXA1 e dos receptores FPR1 e FPR2 no leiomioma e ADC endometrial. A imunomarcagem para a proteína ANXA1 foi observada intensamente nas células epiteliais da HES e, especialmente, do ADC endometrial de graus I e II, comparada ao endométrio normal. A expressão aumentada da proteína também ocorreu no epitélio glandular da adenomiose infiltrante da região miometrial e nas células musculares lisas dos leiomiomas em comparação ao miométrio normal. Esses dados corroboram com outras investigações que indicam a ANXA1

na patogênese de neoplasias benignas e malignas de diferentes origens (SHEN *et al.*, 2005; GUO, LIU, SUN, 2013; BOUDHRAA *et al.*, 2016).

Nossos resultados reforçam outros estudos que têm associado a ANXA1 com a progressão em alguns tumores invasivos, sugerindo um papel na regulação da migração/invasão das células epiteliais (BAI *et al.*, 2004; GUO, LIU, SUN, 2013). A ANXA1 também está correlacionada com o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, câncer de pulmão, câncer pancreático, melanoma, câncer de pele não melanoma e CE. O nível aumentado de expressão da ANXA1 promove a carcinogênese da pele e do CE, e beneficia a invasão e metástase do melanoma (GUO, LIU, SUN, 2013).

Em uma investigação (LIN *et al.*, 2007) realizada com 115 pacientes portadores de carcinoma oral, foi demonstrada elevada expressão da ANXA1 no núcleo das células epiteliais tumorais, associada com pobre prognóstico. Por outro lado, Wang *et al.* (2008), mostraram um padrão inverso da imunorreatividade da proteína ANXA1 no tumor cervical uterino, correlacionando a diminuição na expressão da proteína com a progressão da neoplasia.

No útero, a expressão aumentada da ANXA1 foi verificada no CE, sem distinção entre graus, em comparação com o endométrio proliferativo normal, desempenhando um papel importante na regulação da função celular, proliferação, diferenciação e na carcinogênese do endométrio (VOISIN *et al.*, 2011; GUO, LIU, SUN, 2013). Outras análises também mostraram padrão similar da expressão da ANXA1 nas glândulas epiteliais indiferenciadas das biópsias ectópicas, comparado com as glândulas diferenciadas do endométrio ectópico e glândulas endometriais eutópicas, na doença de endometriose (LI *et al.*, 2008; PAULA *et al.*, 2015).

Com relação aos receptores FPRs, observamos aumento na imunorreatividade para o FPR1, na HES, no ADC endometrial de graus I e II, na adenomiose e no leiomioma, comparado aos tecidos normais e nas mesmas regiões observadas da expressão para ANXA1. De maneira interessante, não houve expressão do FPR2 em nenhuma das condições clínicas patológicas estudadas, indicando que as ações da ANXA1 são mediadas especificamente pelo FPR1. Em contraste com nossos resultados, estudos da expressão de ANXA e FPR em outros órgãos mostraram a interação específica da ANXA1 com o receptor FPR2 nos epitélios dos processos ciliares, em modelo de uveíte (GIROL *et al.*, 2013), nas células epiteliais e estromais do tumor mamário (SHIPITSIN *et al.*, 2007; KHAU *et al.*, 2011) e nas células escamosas do carcinoma de laringe (GASTARDELO *et al.*, 2014).

Contudo, em outra investigação também em útero e realizada por meio de análises de imunocitoquímica estrutural (PAULA *et al.*, 2015), os pesquisadores encontraram dados semelhantes aos nossos, pela observação da expressão do FPR1 nas mesmas regiões imunomarcadas para ANXA1, com aumento significativo na expressão do receptor FPR1 nas glândulas do endométrio ectópico em comparação com as eutópicas. Desse modo, nossos dados apontam a relevância da proteína anti-inflamatória ANXA1 com ações mediadas especificamente pelo receptor FPR1 e relacionada ao câncer, reforçando a ideia de que a ANXA1 e o FPR1 podem ser utilizados como marcadores potenciais para o diagnóstico, tratamento e prognóstico de tumores (GUO, LIU, SUN, 2013; BOUDHRAA *et al.*, 2016).

A imunomarcação positiva para ANXA1 e FPR1 também foi verificada nos MCs em todas as variáveis clínico-patológicas estudadas, com maior imunomarcação das proteínas observadas conforme o aumento do grau de malignidade das lesões uterinas, bem como na adenomiose. De acordo com a literatura, MCs contendo ANXA1 foram observados pela primeira vez no tecido conjuntivo de roedores, no processo inflamatório agudo do mesentério (OLIANI *et al.*, 2000). Em outro estudo, Oliani (2008) e colaboradores também observaram MCs positivos para ANXA na inflamação granulomatosa crônica dos ratos. Nossos dados corroboram com estudos, que constataram a expressão da proteína nos MCs na endometriose (PAULA *et al.*, 2015), e indicam que os MCs são fontes de ANXA para o tecido, contribuindo na inflamação e nas neoplasias benignas e malignas do útero.

Em conjunto, os nossos resultados mostram variação na quantidade e heterogeneidade dos MCs nas diferentes condições clínicas estudadas, e sugerem a participação da triptase na no processo inflamatório da adenomiose, e na progressão tumoral no ADC, e de ambas as proteases na HES e no leiomioma. Além disso, a acentuada imunomarcação da proteína ANXA1 e, especificamente, do receptor FPR1, nos tecidos e nos MCs, nas biópsias estudadas, indicam seu envolvimento, por mediação específica, no desenvolvimento inflamatório e neoplásico do útero o que pode levar a perspectivas promissoras em intervenções clínicas do câncer uterino.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições propostas, permitem concluir:

- MCs intactos são encontrados no miométrio e endométrio normais, aumentam em número nas HES, nas margens tumorais e nos ADCs de graus I e II, nas adenomioses e nas regiões peritumorais dos leiomiomas, com diminuição acentuada dessas células no leiomioma.
- Predomínio dos MCs triptase positivos na adenomiose e margens peritumorais de ADC endometrial de graus I e II.
- Ausência de imunorreatividade para o receptor FPR2 em todas as condições clínico-patológicas estudadas.
- Forte expressão da ANXA1 e FPR1 nos MCs em todas variáveis clínicas avaliadas, especialmente nos ADCs de ambos os graus e na adenomiose.
- As expressões da ANXA1 e do FPR1 são significativamente maiores nas células epiteliais do ADC endometrial de graus I e II em relação ao tecido uterino normal.

Associados, nossos dados mostram variações nas subpopulações dos MCs triptase e quimase positivos de acordo com a condição clínica estudada, e apontam a interação específica ANXA1/FPR1 na inflamação e no desenvolvimento neoplásico do útero.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S. H. et al. Differential expression of annexin I in human mammary ductal epithelial cells in normal and benign and malignant breast tissues. **Clin Exp Metastasis**, v. 15, n. 2, p. 151-6, Mar 1997.
- AL-JEFOUT, M. et al. Novel finding of high density of activated mast cells in endometrial polyps. **Fertil Steril**, v. 93, n. 3, p. 1104-6, Sep 2009. ISSN 1556-5653.
- AMMENDOLA, M et al. Targeting mast cells tryptase in tumor microenvironment: a potential antiangiogenetic strategy. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 154702, 2014. ISSN 2314-6141.
- AMMENDOLA, M et al. Mast Cell-Targeted Strategies in Cancer Therapy. **Transfus Med Hemother**, v. 43, p. 109-13, Mar 2016. ISSN 1660-3796.
- ANAF, V.; CHAPRON, C.; EL NAKADI, I. et al. Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. **Fertil Steril**, 86(5):1336–1343. Nov 2006. ISSN 1556-5653.
- ANDERSSON, C. et al. Revisiting the role of the mast cell in asthma. **Curr Opin Pulm Med**, v. 22, p. 10-7, Jan 2016. ISSN 1531-6971.
- BABBIN, B. A. et al. Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. **J Biol Chem**, v. 281, n. 28, p. 19588-99, Jul 2006. ISSN 0021-9258.
- BAI, X. F. et al. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 10, p. 1466-70, May 2004.
- BAIRD, D.D.; DUNSON, D.B.; HILL, M.C.; COUSINS, D.; SCHECTMAN, JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. **Am J Obstet Gynecol**, 188,100 – 107, 2003.
- BECKER, M. et al. Quality of life and sexual functioning in endometrial cancer survivors. **Gynecol Oncol**, v. 121, n. 1, p. 169-73, Apr 2011. ISSN 1095-6859.
- Borah, B.J et al. The impact of uterine leiomyomas: a national survey of affected women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 209, p. 319.e1-319.e20, Oct 2013. ISSN 1097-6868.
- BOUDHRAA, Z. et al. Annexin A1 localization and its relevance to cancer. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, p. 205-20, Feb 2016. ISSN 1470-8736.
- BOYRAZ, G et al. Does Preoperative Diagnosis of Endometrial Hyperplasia Necessitate Intraoperative Frozen Section Consultation?. **Balkan Med J**, v. 33, n. 6, p. 657-661, Nov 2016. ISSN 2146-3131.
- CALMON, M. F. et al. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53260, 2013.

CINEL, L.; ABAN, M.; BASTURK, M. et al. The association of mast cell density with myometrial invasion in endometrial carcinoma: a preliminary report. **Pathol Res Pract**, vol 205, p. 255-8, 2009. ISSN 1618-0631.

CORONADO, GD.; MARSHALL, LM.; SCHWARTZ, SM. Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population -based study. **Obstet Gynecol**, 95,764 – 769, 2000.

COUSSENS, L.M.; RAYMOND, W.W.; BERGERS, G.; LAIG-WEBSTER M.; BEHRENDTSEN O.; WERB Z.; CAUGHEY, G.H.; HANAHAN, D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev**, 13:1382–1397, 1999.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; RIBATTI, D. Mast cells and tumour angiogenesis: New insight from experimentalcarcinogenesis. **Cancer Lett**, 269:1–6, 2008.

DA SILVA, P.S.; GIROL, A.P.; OLIANI, S.M. Mast cells modulate the inflammatory process in endotoxin-induced uveitis. **Mol Vis**, v. 17, p. 1310-9, 2011. ISSN 1090-0535.

DABIRI, S.; HUNTSMAN, D.; MAKRETISOV, N.; CHEANG, M.; GILKS, B.; BAJDIK, C.; GELMON, K.; CHIA, S.; HAYES, M. The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. **Mod Pathol**, 17:690–695, 2006.

DE SOUZA JUNIOR, D. A. et al. The Role of Mast Cell Specific Chymases and Tryptases in Tumor Angiogenesis. **Biomed Res Int**, v.2015, p. 142359, 2015. ISSN 2314-6141.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 2, p. 152-69, Sep 2008. ISSN 0007-1188.

D'SOUZA, O.A.; RAMESHKUMAR, K.; NIRMALA, V. Mast cells and macrophages in endometrial lesions. **Indian J. Pathol. Microbiol**, v. 37, p. 367–373, Oct 1994. ISSN 0377-4929.

DREW, E.; MERKENS, H.; CHELLIAH, S.; DOYONNAS, R.; MCNAGNY, K.M. CD34 is a specific marker of mature murine mast cells. **Exp Hematol**, 30:1211, 2002.

DYDUCH, G; KACZMARCZYK, K ; OKOŃ, K. Mast cells and cancer: enemies or allies?. **Pol J. Pathol**, v. 63, n. 1, p. 1-7, Mar 2012.

EL-HAMERNEH, T. et al. Cellular immune environment in endometrial polyps. **Fertil Steril**, v. 100, n. 5, p. 1364-72, Nov 2013. ISSN 1556-5653.

EROL, A. Y. G. et al. The role of mast cells and angiogenesis in benign and malignant neoplasm of the uterus. **Pathol Res Pract**, v. 207, n. 10, p. 618-22, Oct 2011. ISSN 1618-0631.

FARQUHAR, CM.; STEINER, CA. Hysterectomy rates in the United States 1990 –1997. **Obstet Gynecol**, 99,229 – 234, 2002.

FIORUCCI, L.; ASCOLI, F. Mast cell tryptase, a still enigmatic enzyme. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, p. 1278-95, Jun 2004. ISSN 1420-682X.

FUJIWARA, H.; KONNO, R.; NETSU, S. et al. Localization of mast cells in endometrial cysts. **Am J Reprod Immunol**, 51(5):341–344. May 2004. ISSN 1046-7408.

GASTARDELO, T.S.; CUNHA, B.R.; RAPOSO, L.S. et al. Inflammation and Cancer: Role of Annexin A1 and FPR2/ALX in Proliferation and Metastasis in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. **PLoS ONE**, 9(12): e111317, Dec 2014. ISSN 1932-6203

GAVINS F.N.; HICKEY M.J. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. **Front Immunol**, 3:354, 2012.

GIL C.; LA M.; PERRETTI M.; OLIANI S.M. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. **Cell Biol Int**, 30(4):338–344, 2006. doi:10.1016/j.cellbi.2005.12.010

GIROL, A. P. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol**, v. 190, n. 11, p. 5689-701, Jun 2013. ISSN 1550-6606.

GOBBETTI, T.; COORAY, S. N. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. **Biol Chem**, v. 397, p. 981-93, Oct 2016. ISSN 1437-4315.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 2010. ISSN 1097-4172.

GU, W.; CHEN, C.; ZHAO, K. N. Obesity-associated endometrial and cervical cancers. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 5, p. 109-18, 2013. ISSN 1945-0508.

GULUBOVA, M.; VLAYKOVA, T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, p. 1265-75, Jul 2009. ISSN 1440-1746.

GUO, C.; LIU, S.; SUN, M. Z. Potential role of Anx1 in cancer. **Future Oncol**, v. 9, p. 1773-93, Nov 2013. ISSN 1744-8301.

IHARA, T.; UCHIIDE, I.; SUGAMATA, M. Light and electron microscopic evaluation of antileukotriene therapy for experimental rat endometriosis. **Fertil Steril**, 81(Suppl 1):819–823. Mar 2004. ISSN 0015-0282.

JENSEN, F. et al. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. **PLoS One**, v. 5, p. e14409, Dec 2010. ISSN 1932-6203.

JEZIORSKA, M.; SALAMONSEN, L. A.; WOOLLEY, D. E. Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Biol. Reprod**, 53: 312-320. 1995.

JIANG, L. et al. Role of mast cells in gynecological neoplasms. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 18:773-81, Jan 2013.

JUNANKAR, S. R. et al. Analysis of immune cell infiltrates during squamous carcinoma development. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 11, p. 36-43, Sep 2006. ISSN 1087-0024.

JUREMALM M, NILSSON G. Chemokine receptor expression by mast cells. **Chem Immunol Allergy**, v. 87, p. 130-144, 2005.

KASHIWASE, Y. et al. Quantitative analysis of mast cells in benign and malignant breast lesions. Immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 134, p. 199-205. Jul 2004. ISSN 1018-2438.

KEMPURAJ D.; PAPADOPOULOU N.; STANFORD E.J. et al. Increased numbers of activated mast cells in endometriosis lesions positive for corticotropin-releasing hormone and urocortin. **Am J Reprod Immunol** 52(4):267–275. Oct 2004. ISSN 1046-7408.

KHAU, T. et al. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2. **FASEB J**, v. 25, n. 2, p. 483-96, Feb 2011. ISSN 1530-6860.

KHAZAIE, K. et al. The significant role of mast cells in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 30, n. 1, p. 45-60, Mar 2011. ISSN 1573-7233.

KITAMURA, T.; KOMETANI, K.; HASHIDA, H.; MATSUNAGA, A.; et al. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. **Nat Genet**, v. 39, p. 467–475, 2007.

Laganà, A. S. et al. Endometrial preparation with Dienogest before hysteroscopic surgery: a systematic review. **Arch Gynecol Obstet**, Nov 2016. ISSN 1432-0711.

LEE, S.; KIM, J.B.; JANG, S. H. et al. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. **J. Immunol**, 185: 756-762. 2010.

LEONI, G. NUSRAT, A. Annexin A1: shifting the balance towards resolution and repair. **Biol Chem**, v. 397, n. 10, p. 971-9, Oct 2016. ISSN 1437-4315.

LI C.Y.; LANG J.H.; LIU H.Y.; ZHOU H.M. Expression of Annexin-1 in patients with endometriosis. **Chin Med J (Engl)** 121(10):927–931, 2008.

LIANG, S. et al. CyclinD1, a prominent prognostic marker for endometrial diseases. **Diagn Pathol**, v. 8, n. 1, p. 138, Aug 2013. ISSN 1746-1596.

LIM, L. H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 968-75, Apr 2007. ISSN 1530-6860.

LÜ, J.Q.; ZHU, X.Q.; DONG, K. et al., Study of the mechanism of mast cell increase in cellular leiomyoma of uterus. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 42, p. 390–393. Jun 2007. ISSN 0529-567X.

MALTBY, S.; KHAZAIE, K.; MCNAGNY, K. M. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, n. 1, p. 19-26, Aug 2009. ISSN 0006-3002.

MATIAS-GUIU, X.; PRAT, J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. **Histopathology**, v. 62, n. 1, p. 111-23, Jan 2013. ISSN 1365-2559.

MASAKI, T. et al. Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 24, n. 1, p. 72-81, Jul 1996.

METCALFE, D. D.; SCHWARTZ, L. B. Assessing anaphylactic risk? Consider mast cell clonality. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 3, p. 687-8, Mar 2009. ISSN 1097-6825.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 4, p. 271-89, Jul 2016. ISSN 1542-4863.

MOSS, S. E.; MORGAN, R. O. The annexins. **Genome Biol**, v. 5, n. 4, p. 219, Mar 2004.

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, Apr 2011. ISSN 1879-0305.

NEZHAT, C. et al. Strong Association Between Endometriosis and Symptomatic Leiomyomas. **JLS**, v. 20, 2016. ISSN 1938-3797.

NORRBY, K.; WOOLLEY, D. Role of mast cells in mitogenesis and angiogenesis in normal tissue and tumour tissue. **Adv. Biosci.** 89 (1993) 71–115.

OLIANI, S.M. et al. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. **Lab Invest**, v. 80, n. 9, p. 1429-38. ISSN 0023-6837.

OLIANI S.M.; PAUL-CLARK M.J.; CHRISTIAN H.C., et al. (2001) Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol.** 158(2):603–615

OKOGBO, FO.; EZECHI, OC.; LOTO, OM.; EZEGBI, PM. Uterine Leiomyomata in South Western Nigeria: a clinical study of presentations and management outcome. **Afr Health Sci**, 11(2):271-8, Jun 2011.

PANSRIKAEW, P. et al. Correlation of mast cell density, tumor angiogenesis, and clinical outcomes in patients with endometrioid endometrial cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 11, n. 2, p. 309-12, 2010. ISSN 1513-7368.

PAULA, R. et al. The intricate role of mast cell proteases and the annexin A1-FPR1 system in abdominal wall endometriosis. **Journal of Molecular Histology**, v. 46, p. 33-43, 2014.

PAWELETZ, C. P. et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. **Cancer Res**, v. 60, n. 22, p. 6293-7, Nov 2000.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation., v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009. ISSN 1474-1741.

PONTIS, A. et al. Adenomyosis: a systematic review of medical treatment. **Gynecol Endocrinol**, v. 32, n. 9, p. 696-700, Sep 2016. ISSN 1473-0766.

RIBATTI, D.; FINATO, N.; CRIVELLATO, E. et al. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in human endometrial cancer. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 193, n.6 , p. 1961–1965. Dec 2005. ISSN 10976868.

RIBATTI, D.; BELLONI, A. S.; NICO, B. et al. Tryptase- and leptin-positive mast cells correlate with vascular density in uterine leiomyomas. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.196, n.5, p. 470.e1-7. May 2007, ISSN 1097-6868.

RONG, B. et al. Elevated serum annexin A1 as potential diagnostic marker for lung cancer: a retrospective case-control study. **Am J Transl Res**, v. 6, n. 5, p. 558-69, 2014.

SANDERSON, P. A. et al. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. **Hum Reprod Update**, Dec 2016. ISSN 1460-2369.

SANSONE, P.; BROMBERG, J. Environment, inflammation, and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 21, n. 1, p. 80-5, Feb 2011. ISSN 1879-0380.

SAWATSUBASHI, M.; YAMADA, T.; FUKUSHIMA, N.; et al. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Virchows Arch**, v. 436, p. 243–248, 2000.

SEIKKULA, J.; NIINIMÄKI, M.; SUVITIE, P. Adenomyosis - diagnostic and therapeutic challenge. **Duodecim**, v. 132, n. 9, p. 836-43, 2016. ISSN 0012-7183.

SETIAWAN, V. W. et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? **J Clin Oncol**, v. 31, n. 20, p. 2607-18, Jul 2013. ISSN 1527-7755.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 62, n. 4, p. 220-41, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1542-4863.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA Cancer J Clin**, v. 67, n. 1, p. 7-30, Jan 2017. ISSN 1542-4863.

SILISTINO-SOUZA, R. et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **Int J Cancer**, v. 120, n. 12, p. 2582-9, Jun 2007. ISSN 0020-7136.

SILVA, J. L. et al. Endometrial cancer: redefining the molecular-targeted approach. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 76, n. 1, p. 1-11, Jul 2015. ISSN 1432-0843.

SIMIONESCU, C. et al. Tumor angiogenesis, macrophages and mast cell microdensities in endometrioid endometrial carcinoma. **Oncol Lett**, v. 6, n. 2, p. 415-420, Aug 2013. ISSN 1792-1074.

SINNIAH, A. et al. The role of the Annexin-A1/FPR2 system in the regulation of mast cell degranulation provoked by compound 48/80 and in the inhibitory action of nedocromil. **Int Immunopharmacol**, v. 32, p. 87-95, Mar 2016. ISSN 1878-1705.

SHEN, D. et al. Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high throughput analyses. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 326, n. 1, p. 218-27, Jan 2005.

SHIPITSIN, M. et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. **Cancer Cell**, v. 11, n. 3, p. 259-73, Mar 2007. ISSN 1535-6108.

SOUCEK, L.; LAWLOR, E.R.; SOTO, D.; SHCHORS, K.; SWIGART, L.B.; EVAN, G.I. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. **Nat Med**, v. 13, p. 1211–1218, 2007.

STROUCH, M.J.; CHEON, E.C.; SALABAT, M.R. et al. (2010). Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. **Clin Cancer Res**, 16: 2257–2265.

SUGAMATA, M.; IHARA, T.; UCHIIDE, I. Increase of activated mast cells in human endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, 53(3):120–125. MAR 2005. ISSN 1046-7408.

SWEDENBORG, J.; MÄYRÄNPÄÄ, M.; I.KOVANEN, P. T. Mast cells: important players in the orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, p. 734-40, Apr 2011. ISSN 1524-4636.

THEOHARIDES, T. C.; COCHRANE, D. E. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. **J Neuroimmunol**, v. 146, p. 1-12. Jan 2004. ISSN 0165-5728.

THEOHARIDES, T. C.; STEWART, J.M. Genitourinary mast cells and survival. **Transl Androl Urol**, v. 4, p. 579-86, Oct 2015.

TSAI, C. L. et al. Estradiol and Tamoxifen Induce Cell Migration through GPR30 and Activation of Focal Adhesion Kinase (FAK) in Endometrial Cancers with Low or without Nuclear Estrogen Receptor α (ER α). **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e72999, 2013. ISSN 1932-6203.

VOISIN, S. N.; KRAKOVSKA, O.; MATTA, A.; et al. Identification of novel molecular targets for endometrial cancer using a drill-down LC-MS/MS approach with iTRAQ. **PLoS One**. v. 6, p. e16352, 2011. ISSN 1932-6203.

WALTHER, A.; RIEHEMANN, K.; GERKE, V. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. **Mol Cell**, v. 5, n. 5, p. 831-40, May 2000. ISSN 1097-2765.

WANG, L.D.; YANG, Y.H.; LIU, Y. et al. Decreased expression of annexin A1 during the progression of cervical neoplasia. **J Int Med Res**, v. 36, n. 4, p. 665-72, Jul-Aug 2008. ISSN 0300-0605.

WELSH, T.J.; GREEN, R.H.; RICHARDSON, D.; et al. Macrophage and mast cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, p.8959–8967, 2005.

XIN, W. et al. Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression. **Am J Pathol**, v. 162, n. 1, p. 255-61, Jan 2003.

XUE, L.Y.; TENG, L. H.; ZOU, S. M. et al. Expression of annexin I in different histological types of carcinomas. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 29, n. 6, p. 444-8, Jun 2007. ISSN 0253-3766.

YE, H. et al. Effect of matrix metalloproteinase promoter polymorphisms on endometriosis and adenomyosis risk: evidence from a meta-analysis. **J Genet**, v. 95, n. 3, p. 611-9, Sep 2016. ISSN 0973-7731.

YE, R. D. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol Rev**, v. 61, n. 2, p. 119-61, Jun 2009. ISSN 1521-0081.

YOM, C. K. et al. Clinical significance of annexin A1 expression in breast cancer. **J Breast Cancer**, v. 14, n. 4, p. 262-8, Dec 2011. ISSN 2092-9900.

ZHU, X.Q.; SHI, Y.F.; ZHOU, C.Y. Mast cells in cellular leiomyoma and endometrial stromal sarcoma of the uterus. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 26, p. 168–172. Mar 2004.

ZHU, X. Q. et al. Expression of chemokines CCL5 and CCL11 by smooth muscle tumor cells of the uterus and its possible role in the recruitment of mast cells. **Gynecol Oncol**, v. 105, p. 650-6. Jun 2007. ISSN 0090-8258.

ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FIPA



C E P – Comitê de Ética em Pesquisa
FIPA – Faculdades Integradas “Padre Albino”
Rua dos Estudantes 225, Parque Iracema, CEP 15809-144 – Catanduva-SP
Fone (17) 3311 3229 – www.fundacaopadrealbino.org.br
cep@fipa.com.br



Catanduva, 03 de dezembro de 2015.

*Deliberação nº 60/15
CEP/FIPA/trbm*

CAAE: 44142215.6.0000.5430 - Plataforma Brasil - CONEP
Parecer de Aprovação nº 1.346.774 de 02/12/2015.

*Prof. Dra. Ana Paula Girol
Pesquisador(a) Responsável*

Prezado(a) Senhor(a):

Vimos informar V.Sa., que o Projeto do Trabalho de Pesquisa intitulado “**Análise da heterogeneidade dos mastócitos e expressão da proteína Anexina A1 e receptor FPR em variáveis clínico-patológicas de lesões uterinas**”, foi avaliado por este Comitê de Ética e Pesquisa e considerado **aprovado**, de acordo com as exigências das Resoluções do Conselho Nacional de Saúde - CNS nº 466/12, de 12 de dezembro de 2012.

O registro de aprovação do referido Protocolo gerado no sistema da Plataforma Brasil/CONEP pelo Comitê de Ética em Pesquisa das Faculdades Integradas Padre Albino é Parecer nº 1.346.774 de 02/12/2015.

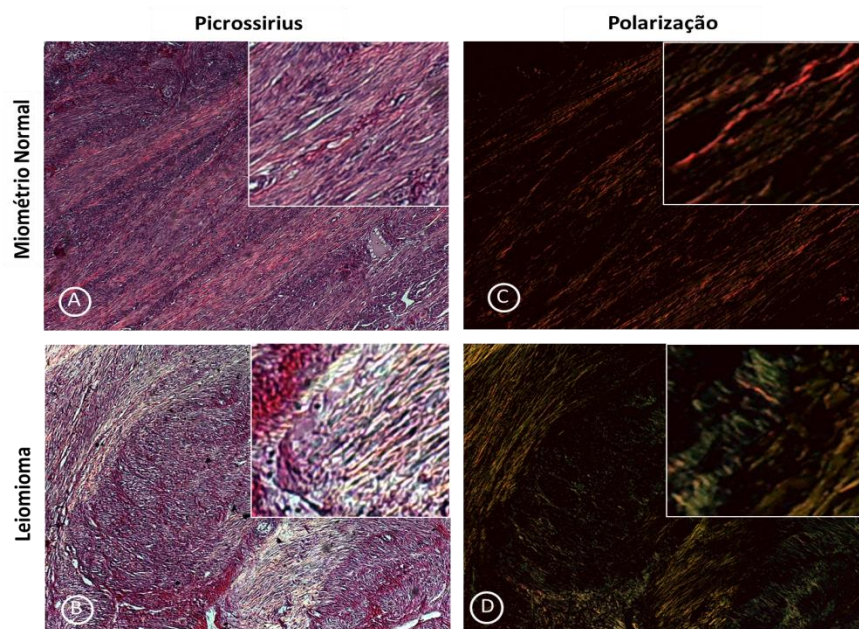
Cabe ao pesquisador informar sobre qualquer evento adverso ocorrido no estudo local; qualquer alteração no projeto, bem como, **enviar o relatório completo ao final da pesquisa**, por meio do sistema Plataforma Brasil.

Sendo o que temos a informar, subscrevemo-nos.

Atenciosamente.


Prof. Me. Ricardo Alessandro Teixeira Gonsaga
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FIPA

APÊNDICE A

ANEXINA A1 E METALOPROTEINASES DE MATRIZ EM NEOPLASIAS
UTERINAS

ANEXINA A1 E METALOPROTEINASES DE MATRIZ EM NEOPLASIAS UTERINAS

ANNEXIN A1 AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN UTERINE NEOPLASIAS

ANEXINA A1 Y METALOPROTEINASAS DE MATRIZ DE EN NEOPLASIAS UTERINAS

Sara de Souza Costa^{*}, Bianca Zanforlim Zago^{**}, Márcio Shudi Kanda^{**}, Stephanie Cecília Barbosa Drudi^{**}, Mairto Roberis Geromel^{***}, Ana Paula Girol^{****}

Resumo

Introdução: As neoplasias uterinas são causas importantes de desconforto, infertilidade e óbito entre as mulheres no Brasil e no mundo. Nesse cenário, destaca-se a proteína anti-inflamatória anexina A1 (ANXA1) que tem sido associada com a progressão em tumores indicando que essa proteína regula o processo de migração/invasão celular. **Objetivo:** Analisar, por imuno-histoquímica, a expressão da ANXA1 e sua correlação com as metaloproteínases de matriz (MMP-2 e MMP-9), bem como com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no leiomioma e no adenocarcinoma de endométrio. **Material e Métodos:** As análises foram realizadas em biópsias de leiomiomas e adenocarcinomas. Amostras de útero normal foram usadas como controle. A quantificação da expressão das proteínas foi feita por densitometria. **Resultados:** Nossos resultados mostraram aumento da expressão da proteína nos tumores benignos e malignos. **Conclusão:** Similarmente, observamos expressões aumentadas de MMPs e VEGF nas neoplasias uterinas, o que parece indicar a participação da proteína ANXA1 nos processos de proliferação e invasão celular.

Palavras-chave: Leiomioma. Adenocarcinoma de endométrio. Metaloproteínases de matriz. VEGF. Biomarcadores tumorais.

Abstract

Introduction: Uterine neoplasias are major causes of discomfort, infertility and death among women in Brazil and worldwide. In this scenario, we highlight the anti-inflammatory protein annexin A1 (ANXA1) that has been associated with progression in tumors indicating that this protein regulates the migration/cell invasion processes. **Objective:** to analyze, by immunohistochemistry, the expression of ANXA1 and its correlation with matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9), as well as the vascular endothelial growth factor (VEGF) in leiomyoma and endometrial adenocarcinoma. The analyzes were performed on biopsies from leiomyomas and adenocarcinomas. Normal uterus samples were used as controls. The quantification of the protein expression was performed by densitometry. **Results:** our results showed increased protein expression in benign and malignant tumors. **Conclusion:** similarly, we observed increased expression of MMPs and VEGF in the uterine neoplasias which seems to indicate the participation of ANXA1 protein in proliferation and cell invasion.

Keywords: Leiomyoma. Endometrial adenocarcinoma. Matrix metalloproteinases. VEGF. Tumor biomarkers.

^{*} Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), de São José do Rio Preto-SP.

^{**} Acadêmicos do curso de Medicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) de Catanduva-SP.

^{***} Técnico do Laboratório de Histopatologia e Imuno-histoquímica das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

^{****} Bióloga, Mestre em Morfologia pela UNIFESP, Doutora em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular e Pós-Doutora em Imunomorfologia pela UNESP de São José do Rio Preto-SP. Professora (nível I) das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia das FIPA e docente da Pós-Graduação em Genética, UNESP de São José do Rio Preto-SP. Contato: anapaulagirol@hotmail.com

Trabalho desenvolvido nos laboratórios de Histopatologia, Imuno-histoquímica e Multidisciplinar das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), Catanduva-SP.

Resumen

Introducción: El cáncer uterino son las principales causas de malestar, la infertilidad y la muerte entre las mujeres en Brasil y en todo el mundo. En este escenario, no es el anti-inflamatoria anexina proteína A1 (ANXA1) que se ha asociado con la progresión de los tumores indican que esta proteína regula la invasión migración / célula. **objetivo:** analizar, mediante inmunohistoquímica, la expresión de ANXA1 y su correlación con las metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9), así como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en leiomioma y adenocarcinoma endometrial. Los análisis se realizaron en biopsias de leiomiomas y adenocarcinomas. Muestras de útero normal se utilizaron como controles. La cuantificación de la expresión de la proteína se realizó por densitometría. **Resultados:** Nuestros resultados mostraron un aumento de expresión de la proteína en los tumores benignos y malignos. **Conclusión:** Del mismo modo, se observó aumento de la expresión de MMPs y el cáncer uterino VEGF, lo que parece indicar la participación de la proteína ANXA1 en la proliferación y la invasión celular.

Palabras clave: Leiomioma. Cáncer de endometrio. Metaloproteinasas de matriz. VEGF. Biomarcadores tumorales.

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de endométrio é o tumor ginecológico maligno mais comum em países industrializados e sua incidência vem aumentando nos últimos anos^{1,2}. Entre os fatores de risco associados ao desenvolvimento desses tumores estão obesidade, anovulação, nuliparidade e menopausa³.

O diagnóstico de adenocarcinoma de endométrio é normalmente feito durante a avaliação de hemorragia vaginal anormal, sendo que 75% dos tumores de endométrio são diagnosticados numa fase precoce. O sangramento peri ou pós-menopausa anormal é associado ao câncer de endométrio em cerca de 10% dos casos de hiperplasia endometrial atípica, a qual pode ser considerada precursora do câncer de endométrio. O uso da terapia de reposição hormonal combinada estrógeno-progesterona pode reduzir o risco de carcinoma de endométrio⁴.

Outra neoplasia comum do trato reprodutivo feminino é o leiomioma uterino, ou fibroma, que afeta 30% das mulheres em idade reprodutiva com aumento da incidência para 70-80% aos 50 anos de idade⁵. Os leiomiomas apresentam como sintomas pressão e dores pélvicas, sangramento uterino anormal e disfunção reprodutiva, incluindo a redução da fertilidade ou complicações na gravidez⁶. Ainda, os leiomiomas uterinos são causas frequentes de histerectomia^{7,8}.

No desenvolvimento das neoplasias, a invasão das células tumorais é devida a uma série complexa de eventos entre o hospedeiro e o tumor, envolvendo a migração das células tumorais e a desintegração da matriz tumoral. Devido a esse fato, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biologia dos tumores malignos e benignos é essencial para a identificação de candidatos a marcadores prognósticos, novos alvos terapêuticos e estratégias de detecção precoce preditivas de sobrevivência. Nesse cenário, destaca-se a

proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1) da superfamília das anexinas⁹. Treze membros da família das anexinas foram descritos e clonados em mamíferos e, em humanos, o gene *ANXA1*, está localizado na região cromossômica 9q12-9q21.2^{10,11}.

A ANXA1 apresenta múltiplas funções em diferentes sistemas e a expressão alterada dessa proteína tem sido associada à transformação celular, progressão tumoral e metástase¹¹. Uma função da ANXA1 na proliferação celular é o seu papel como substrato para o domínio da tirosina-quinase pertencente ao receptor para fator de crescimento epidérmico (EGFR) inibindo a proliferação de células epiteliais¹¹. A ANXA1 modula a resistência a drogas em tumores e regula a proliferação celular, e ainda, a sua associação no desenvolvimento da metástase em alguns tumores sugere a participação dessa proteína no processo de migração/invasão celular¹¹.

Com essas considerações, o estudo da proteína ANXA1 e de suas possíveis correlações com as metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9), bem como, com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em neoplasias uterinas benignas e malignas é importante, pois os mecanismos de ação pelos quais a proteína atua na biologia tumoral são ainda pouco conhecidos nos tumores uterinos. Além disso, esses estudos poderão contribuir na identificação de novos alvos prognósticos e/ou terapêuticos no adenocarcinoma de endométrio e no leiomioma uterino.

MATERIAIS E MÉTODO

Obtenção do material e análises histopatológicas

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), protocolo n°. 293.198. As análises foram realizadas em biópsias de neoplasias uterinas benignas e malignas, incluídas em parafina, provenientes do Serviço de Patologia da FIPA. Foram selecionados casos de leiomiomas (n=10), adenocarcinomas de endométrio (n=10) e úteros normais (n=10). Os blocos de parafina, contendo fragmentos de biópsias, foram utilizados para a obtenção de cortes de 5µm e, em seguida, processados e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para confirmação dos diagnósticos e pelo método Picrossirius-Hematoxilina e Polarização para evidenciar as fibras de colágeno.

Análises imuno-histoquímicas

A detecção da proteína ANXA1, das enzimas MMP-2 e MMP-9 e do VEGF foi realizada em cortes de 5µm das biópsias selecionadas. Após desparafinização, recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena, as secções foram incubadas com os anticorpos primários policlonais *rabbit*: anti-ANXA1 (1:2000) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK), anti-MMP-2 e anti-MMP-9 (1:200) (Abcam, Cambridge, MA, USA) e anti-VEGF (1:400) (Abcam, Cambridge, MA, USA), diluídos em BSA a 1%. A seguir, lavadas com PBS pH 7,4, incubadas com o anticorpo secundário biotilnado, imersas em complexo estreptavidinaperoxidase conjugada, reveladas com o substrato diaminobenzidina e contracoradas com Hematoxilina.

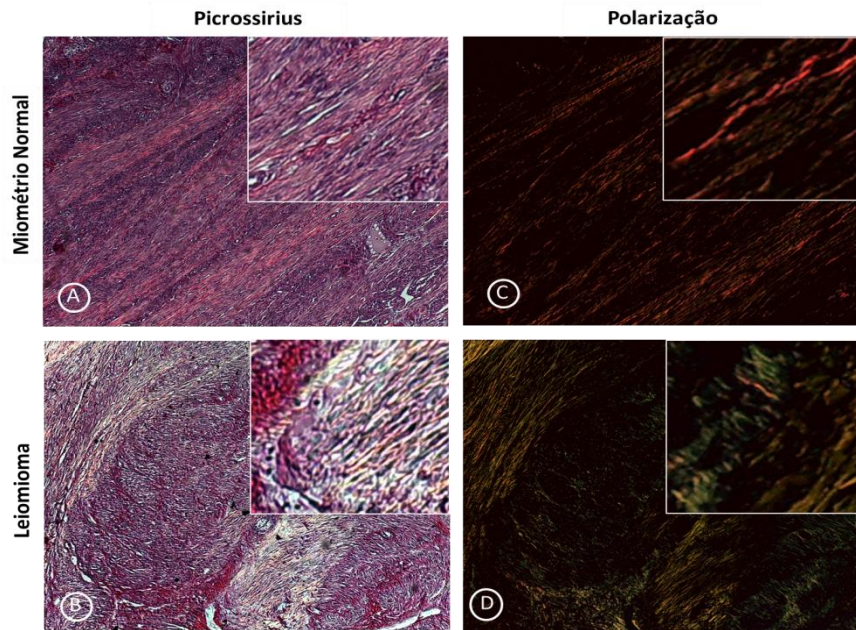
Análises estatísticas

Para as quantificações das proteínas, após as análises imuno-histoquímicas, foram utilizadas três lâminas de cada condição (n=10 por grupo). Por meio do *software Leica Image Analysis* e objetiva de 40X do microscópio Leica DM500, foram analisados 20 pontos em diferentes regiões para a obtenção de uma média relacionada com a intensidade de imunorreatividade. Os valores foram obtidos como unidade arbitrária (u.a) e a densidade óptica média mostrou a intensidade de imunomarcção apenas nas áreas imunorreativas. As médias foram comparadas pela ANOVA, seguidas pelo teste t de *student*. Os dados obtidos foram expressos como média \pm S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Primeiramente, foram analisadas a presença e maturação das fibras de colágeno. Essas foram observadas maduras no miométrio normal, evidenciadas pela coloração avermelhada após polarização. Enquanto no leiomioma, as fibras são mais imaturas e aparecem em tons de verde e amarelo (Figura 1)

Figura 1 - Fibras de colágeno maduras no miométrio normal (A e C) e imaturas no leiomioma (B e D). Coloração Picrossirius-Hematoxilina



As análises imuno-histoquímicas e densitométricas revelaram aumento da ANXA1 no adenocarcinoma de endométrio ($p < 0,01$) comparado ao endométrio controle (Figura 1). A expressão aumentada da proteína também ocorreu no leiomioma ($p < 0,001$) com relação ao miométrio normal (Figura 2).

Figura 2 - Expressão da ANXA1 no endométrio normal (A) e adenocarcinoma de endométrio (B). Controle da reação (C). Barra: 10 μ m. Densitometria da imunorreatividade da Anxa1 (D). Resultados demonstrados como média \pm S.E.M. (n=10). **, $p < 0,01$ versus endométrio controle

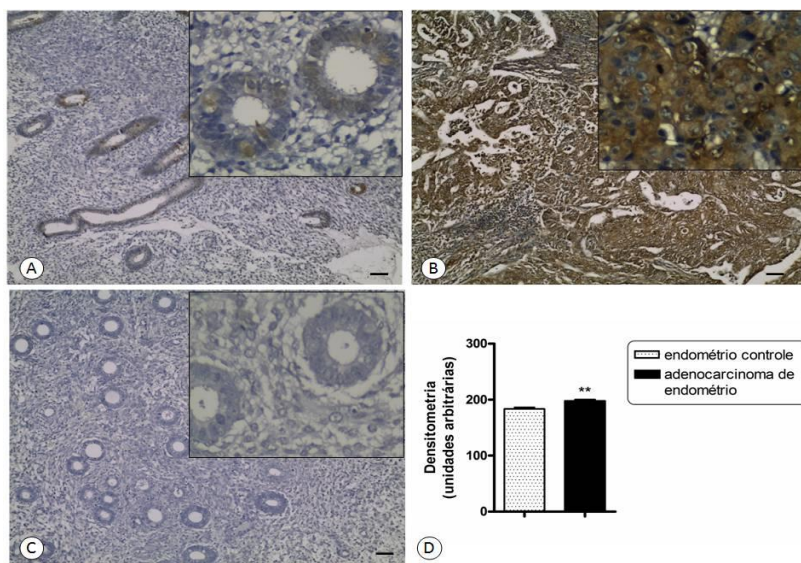
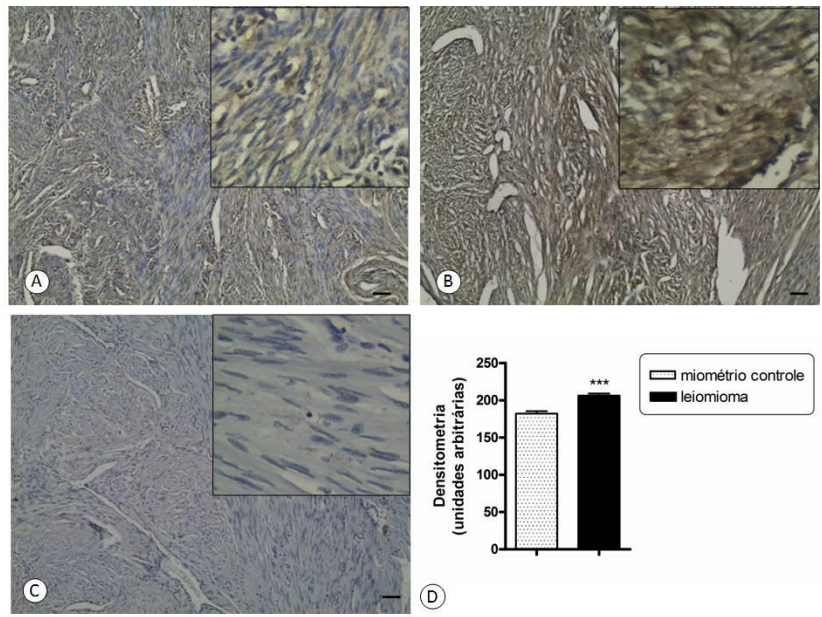
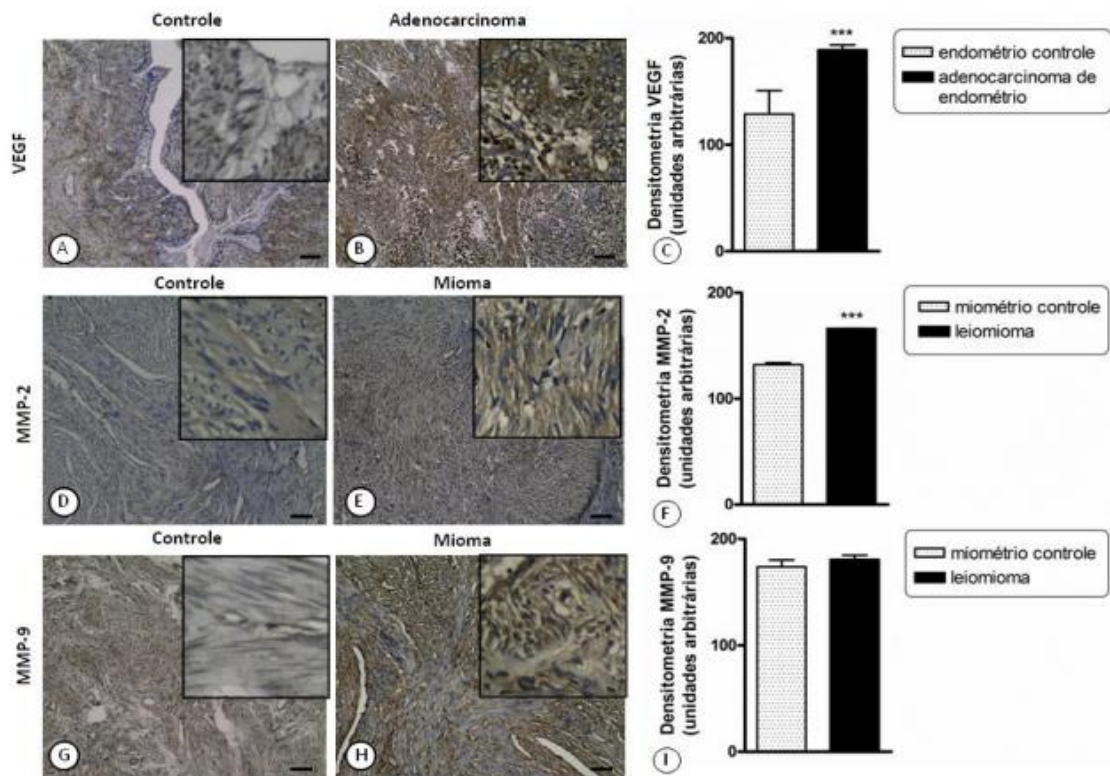


Figura 3 - Expressão da ANXA1 no miométrio normal (A) e leiomioma (B). Contole da reação (C). Barra: 10 μ m. Densitometria da imunorreatividade da ANXA1 (D). Resultados demonstrados como média \pm S.E.M. (n=10). ***, $p < 0,001$ versus miométrio controle



Similarmente, observamos aumento na imunorreatividade para o VEGF ($p < 0,001$) no adenocarcinoma de endométrio e as MMP-2 ($p < 0,001$), MMP-9 no leiomioma comparado aos tecidos normais (Figura 4). Não houve aumento significativo das MMPs no adenocarcinoma e do VEGF no leiomioma comparado aos respectivos controles.

Figura 4 - Expressão do VEGF no endométrio normal (A) e adenocarcinoma de endométrio (B). Imunorreatividade para as MMP-2 e MMP-9 nos tecidos controle (D) e (G) e no leiomioma (E) e (F). Barras: 10 μ m. Densitometria da imunorreatividade do VEGF (C), MMP-2 (F) e MMP-9 (I). Resultados demonstrados como média \pm S.E.M. (n=10). ***, $p < 0,001$ versus tecidos controle



DISCUSSÃO

A expressão e o papel da proteína ANXA1 no câncer, demonstrada em vários estudos, indica a participação dessa proteína na patogênese de neoplasias benignas e malignas de diferentes origens¹²⁻¹⁴. No presente trabalho estudamos a expressão da proteína ANXA1 e sua correlação com o VEGF e as MMP-2 e MMP-9 em leiomiomas uterinos e adenocarcinomas de endométrio.

As análises imuno-histoquímicas dos tumores uterinos mostraram expressão da proteína ANXA1 em todas as condições clínicas estudadas. A imunomarcação para a proteína foi observada mais intensamente nas células epiteliais dos adenocarcinomas de endométrio, comparada ao endométrio normal. Similarmente, ocorreu aumento da imunorreatividade da ANXA1 preferencialmente nas células musculares lisas dos leiomiomas em comparação ao miométrio normal. Nossos resultados corroboram com outros estudos que têm associado a ANXA1 com a progressão em alguns tumores invasivos, sugerindo um papel na regulação da migração/invasão das células epiteliais^{15,16}. Em uma investigação¹² realizada com 115 pacientes portadores de carcinoma oral, foi demonstrada elevada expressão da ANXA1 no núcleo das células epiteliais tumorais, correlacionando com pobre prognóstico.

Por outro lado, alguns pesquisadores observaram diminuição na expressão da ANXA1 na membrana plasmática no carcinoma de laringe, faringe e oral, mostrando a desregulação da expressão da proteína ANXA1 na diferenciação das células epiteliais tumorais^{17,18}. Dados similares foram obtidos em estudos recentes realizados por Wang et al.¹⁹, que verificaram um padrão inverso da imunorreatividade da proteína ANXA1 no tumor cervical uterino, com diminuição na expressão da proteína com a progressão da neoplasia. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a ANXA1 modula essas respostas celulares não estão completamente determinados²⁰ e uma das possíveis ações da proteína pode estar relacionada ao processo de angiogênese.

A angiogênese tumoral é o principal evento envolvido na tumorigênese e é fundamental para a investigação oncológica nos últimos anos. Durante o crescimento tumoral, fatores de angiogênese, incluindo o VEGF, são secretados para promover a vascularização do tumor, o que leva a um crescimento contínuo das células tumorais e invasão nos tecidos e as estruturas adjacentes²¹.

Em relação ao VEGF, observamos aumento da sua expressão nos adenocarcinomas de endométrio, comparado aos tecidos normais; corroborando com dados encontrados na literatura, indicando que o aumento da expressão do VEGF está relacionado com a angiogênese, criando um ambiente propício para o crescimento dessas neoplasias uterinas²¹. O mesmo padrão não foi observado no leiomioma, onde a expressão do VEGF não teve significância estatística. Dados controversos foram constatados em outra pesquisa, nas quais foi relatado o aumento do VEGF em leiomiomas pelos mesmos fatores²².

Outro aspecto a ser considerado no processo de desenvolvimento tumoral é a interação entre as células tumorais e a matriz extracelular, como um passo crítico de invasão tumoral e metástase. As MMPs causam a degradação da matriz extracelular e regulam a adesão de células²³. A MMP-9, em particular, degrada e destrói a matriz adjacente e cria dano vascular na barreira endotelial tumoral, levando a diminuição do impedimento estérico, aumentando permeabilidade vascular e o extravasamento de nutrientes²⁴. Estas alterações da matriz proporcionam espaço para a neovascularização das neoplasias uterinas e promovem o crescimento e invasão tumoral.

Nossos resultados com relação às MMPs também mostraram aumento da expressividade de MMP-2 e MMP-9 nos leiomiomas. Similarmente, foi observado aumento da expressão das MMP-2 e MMP-9 em um estudo realizado por Chang et al.²⁵ em neoplasias do miométrio.

Por outro lado, observamos diminuição das expressões dessas MMPs nos adenocarcinomas de endométrio, corroborando assim com outros pesquisadores²⁶.

As análises de polarização, após a coloração de Picrossirius-Hematoxilina, evidenciaram fibras de colágenos mais imaturas no leiomioma em relação ao miométrio normal, indicando maior renovação. O que pode ser correlacionado ao aumento das MMPs nesse tecido. Nosso resultado corrobora com outro estudo que indica que MMP-2 medeia a clivagem de colágeno tipo IV e outros componentes da matriz extracelular, levando a instabilidade da estrutura da matriz.²⁷

Em conjunto, os nossos dados mostram acentuada imunomarcagem da proteína ANXA1, correlacionada com o aumento das expressões do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no adenocarcinoma de endométrio e das MMP-2 e MMP-9 no leiomioma. Esses resultados indicam participação da proteína nos processos de proliferação celular nas neoplasias uterinas benignas e malignas.

CONCLUSÕES

A diferença da expressão da ANXA1 nas neoplasias uterinas benignas e malignas, associada às expressões de marcadores de desenvolvimento tumoral (VEGF e MMPs), pode ser correlacionada com a progressão tumoral conforme aumenta a invasão e malignidade nessas neoplasias.

REFERÊNCIAS

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar; 65(2):87-108.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan; 66(1):7-30.
3. Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(4):220-41.
4. Cronj HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Obstet.* 2004; 84:101-8.
5. Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188:100-7.
6. Coronado GD, Marshall LM, Schwartz SM. Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population-based study. *Obstet Gynecol.* 2000; 95:764-9.
7. Farquhar CM, Steiner CA. Hysterectomy rates in the United States 1990-1997. *Obstet Gynecol.* 2002; 99:229-34.

8. Okogbo FO, Ezechi OC, Loto OM, Ezeobi PM. Uterine Leiomyomata in South Western Nigeria: a clinical study of presentations and management outcome. *Afr Health Sci.* 2011 Jun; 11(2):271-8.
9. D'acquisto F, Perretti M, Flower R. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol.* 2008 Sep; 155(2):152-69.
10. Huebner K, Cannizzaro LA, Frey AZ, Hecht BK, Hecht F, Croce CM, Wallner BP. Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II. *Oncogene Res.* 1988 May; 2(4):299-310.
11. Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* 2007 Apr; 21(4):968-75.
12. Radke S, Austermann J, Russo-Marie F, Gerke V, Rescher U. Specific association of annexin 1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain. *FEBS Lett.* 2004 Dec; 578(1-2):95-8.
13. Shen D, Chang HR, Chen Z, He J, Lonsberry V, Elshimali Y, Chia D, Seligson D, Goodglick L, Nelson SF, Gornbein JA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jan; 326(1):218-27.
14. Bai XF, Ni XG, Zhao P, Liu SM, Wang HX, Guo B, Zhou LP, Liu F, Zhang JS, Wang K, Xie YQ, Shao YF, Zhao XH. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2004 May; 10(10):1466-70.
15. Cicek M, Samant RS, Kinter M, Welch DR, Casey D. Identification of metastasis-associated proteins through protein analysis of metastatic MDA-MB-435 and metastasis-suppressed BRMS1 transfected-MDA-MB-435 cells. *Clin Exp Metastasis.* 2004; 21(2):149-57.
16. Garcia Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Herrero Zapatero A, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, Rodrigo JP. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol.* 2004; 164(1):73-9.
17. Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Llorente JL, Fresno MF, Allonca E, Suarez C, Hermsen M. Down-regulation of annexin A1 and A2 protein expression in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 2011 Jan; 42(1):88-94.
18. Nomura, H; Uzawa, K; Yamano, Y; Fushimi, K; Nakashima, D; Kouzu, Y, Kasamatsu A, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Jul;135(7):943-9.
19. Wang LD, Yang YH, Liu Y, Song HT, Zhang LY, Li PL. Decreased expression of AnnexinA1 during the progression of cervical neoplasia. *J Int Med Re.* 2008; 36:665-72.
20. Khau T, Langenbach SY, Schuliga M, Harris T, Johnstone CN, Anderson RL, Stewart A G. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2. *FASEB J.* 2011 Feb; 25(2):483-96.
21. Pudevalli VK, Sawaga R. Antiangiogenesis therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. *J Neurooncol.* 2000; 50:189-200.
22. Gentry CC, Okolo SO, Fong LFW, Crow JC, Maclean AB, Perrett CW. Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium. *Clin Sci.* 2001; 101:691-5.
23. Amălinei C, Căruntu ID, Giuscã SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol.* 2010; 51:215-28.
24. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis, Rev.* 26. 717-724, Dec 2007.

25. Chang CC, Kuan TC, Hsieh Y.Y, Ho YJ, Sun YL, Lim CS. Effects of diosgenin on myometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 activity and expression in ovariectomized rats. *Int. J. Biol. Sci.* 2011;7(6):837-47.
26. Mattila AT, Santala M, Soini Y, Hujanen TT. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2005; 25:4101-6.
27. Korompelis P, Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiogou G, Korkolopoulou P, Sepsa A, Antsaklis A, Papavassiliou AG. Expression of vascular endothelial factor-A, gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-1 in uterine leiomyomas. *Clin Chem Lab Med.* 2014 Aug; 53(9):1415-24.