

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 05/06/2020.



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

Janesly Prates

**Interação funcional e molecular da proteína anexina A1 e do
quimioterápico cisplatina no carcinoma de colo de útero**

São José do Rio Preto
2018

Janesly Prates

**Interação funcional e molecular da proteína anexina A1 e do
quimioterápico cisplatina no carcinoma de colo de útero**

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

Financiadoras: CNPq Proc.140883/2014-2
CAPES Proc.99999.000615/2016-01

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia C. Rodrigues
Lisoni

São José do Rio Preto
2018

Prates, Janesly.

Interação funcional e molecular da proteína anexina A1 e do quimioterápico cisplatina no carcinoma de colo de útero / Janesly Prates. -- São José do Rio Preto, 2018
121f. : il.

Orientador: Sonia Maria Oliani

Coorientador: Flávia C. Rodrigues Lisoni

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Apoptose. 2. Colo uterino – Câncer. 3. 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

Janesly Prates

Interação funcional e molecular da proteína anexina A1 e do quimioterápico cisplatina no carcinoma de colo de útero

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

Financiadoras: CNPq – Proc.140883/2014-2
CAPES Proc.99999.000615/2016-01

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva
UNESP- Câmpus São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a Marilia de Freitas Calmon
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto

Prof^a. Dra. Lúcia Buchalla Bagarelli
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ayder Anselmo Gomes Vivi
Faculdade de Medicina de Catanduva, Fac. Integradas Padre Albino

São José do Rio Preto
05 de junho de 2018

DEDICATÒRIA

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida, meus pais, Joacyr e Alaide, meus verdadeiros mestres que dignamente me apresentaram à importância da família, ao caminho da honestidade e são colaboradores das minhas conquistas. Meus mais profundos agradecimentos pelas sábias lições, apoio e amor sincero.

*À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, meu agradecimento pela oportunidade,
orientação e confiança à mim outorgada, permitindo meu crescimento
profissional e pessoal.*

À minha coorientadora, Profa. Dra. Flávia C. Rodrigues Lisoni, pela amizade, carinho, humildade e pelas sugestões e interação com este trabalho que me trouxe mais experiência e amadurecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo agradeço a DEUS pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta de trabalho e estudo, por me iluminar e me dar forças nos momentos difíceis. Agradeço por mais essa vitória!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de Doutorado (processo 140883/2014-2).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado Sanduíche (CAPES/MINCYT, projeto nº259/14, processo 99999.000615/2016-01), permitindo minha estadia em Córdoba/Argentina, a qual tem sido de grande importância.

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

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, e aos funcionários da Seção de Pós-graduação pela atenção e colaboração.

À Profa. Dra. Solange Correa Garcia Pires D'Avila, do Departamento de Análises Anatomopatológicas do Hospital de Base de São José do Rio Preto, por ter cedido e avaliado as amostras teciduais de colo de útero.

À Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky e a aluna Silvana Sandri (USP-SP), pela disponibilidade e auxílio na técnica de ciclo celular.

À Profa. Dra. Silvia Graciela Correa, do *Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología* (CIBICI-CONICET-UNC), *Universidad Nacional de Córdoba*, Córdoba, Argentina, pela oportunidade de desenvolver o doutorado-sanduíche, pelas suas ideias, acolhimento e amizade.

Às Profas. Dra. Ana Paula Girol e Dra. Cristiane Damas Gil pelas contribuições, dedicação e amizade.

Aos queridos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Mab Corrêa, Rafaela Molás, Caroline de Freitas Zanon, Lucas Ribeiro de Azevedo, Thaís Bravo, Juliana P. Gusson e Julliene Guaraldi, uma equipe a qual é exemplo de trabalho com alegria e entusiasmo. Em especial à Jusciéle Brogin Morelli e ao Alexandre Dantas Gimenes pelas preciosas dicas, apoio, discussões, técnicas e aprendizado.

Aos amigos da *Universidad Nacional de Córdoba*, em especial à Lisa Macció Maretto, Bibiana Barrios e Coni Savid Frontera pelas informações, estadia e acolhimento.

Aos meus familiares e demais amigos, pelo apoio e incentivo, que de uma ou de outra maneira deram crédito ao meu trabalho.

A todos, o meu sincero agradecimento.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O câncer de colo de útero apresenta altas taxas de incidência e mortalidade, e sua progressão depende de características genéticas e interações das células tumorais, epiteliais e inflamatórias. A maioria dos protocolos de tratamentos, neste tipo de câncer, utiliza a Cisplatina (Cis). No entanto, este quimioterápico induz efeitos colaterais, como a nefrotoxicidade, por isso alternativas terapêuticas tem sido estudadas, como a proteína anexina A1 (ANXA1), que apresenta ações anti-inflamatória, antiproliferativas e também modula a expressão do gene Inibidor de Diferenciação ao DNA 1 (*ID1*) no processo tumoral. Com essas considerações, o objetivo do trabalho foi investigar a interação molecular dos mediadores ANXA1 e ID1 com a Cis em linhagem celular, e relacionar com tecidos neoplásicos intraepiteliais no processo tumorigênico cervical. As células SiHa (carcinoma epidermóide de cérvix), tratadas com o peptídeo da anexina A1 (AC₂₋₂₆), Cis e AC₂₋₂₆+Cis, foram avaliadas nos ensaios de proliferação, citotoxicidade, migração celular, apoptose, imunolocalização e expressões dos genes *ANXA1* e *ID1*, e das proteínas ANXA1, ID1 e ERK1/2 (Quinase Regulada Extracelularmente 1/2). As amostras de tecidos cervicais foram analisadas histopatologicamente e as expressões proteicas de ANXA1 e ID1, por imuno-histoquímica. Os tratamentos, em todos os grupos, diminuíram a proliferação e migração celular, sem efeitos citotóxicos. Enquanto, Cis e AC₂₋₂₆+Cis induziram as células aos processos de apoptose tardia, diminuição da expressão do ID1 e aumento da ANXA1, indicando a atividade antineoplásica da cisplatina. A administração Cis e AC₂₋₂₆+Cis inativou ERK1/2 fosforilada e induziu a translocação nuclear da ANXA1. As expressões das proteínas ID1 e ANXA1 foram observadas nas amostras teciduais de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC), com intensa imunomarcagem de ID1 em NIC III. Em conjunto, os dados obtidos nesse trabalho fornecem entendimento adicional do mecanismo de ação da cisplatina na modulação dos mediadores *ID1* e *ANXA1* no processo tumorigênico. Esses

achados podem delinear novas estratégias para a intervenção terapêutica no câncer de colo de útero.

Palavras chave: linhagem SiHa, câncer de cérvix uterina, apoptose, ID1, translocação nuclear

ABSTRACT

Cervical cancer presents high rates of incidence and mortality, and its progression depends on genetic characteristics and tumor interactions, epithelial and inflammatory cells. Most treatment protocols, in this type of cancer, use Cisplatin (Cis). However, this chemotherapeutic induces side effects such as nephrotoxicity, so alternative therapies have been studied, such as the Annexin A1 protein (ANXA1), which exhibits anti-inflammatory, antiproliferative actions and also modulates expression of the Inhibitor of Differentiation to DNA 1 (ID1) gene in the tumor process. With these considerations, the objective of this work was to investigate the molecular interaction of the ANXA1 and ID1 mediators with Cis in cell line, and to relate with intraepithelial neoplastic tissues in the cervical tumorigenic process. SiHa (cervical epidermoid carcinoma) cells treated with the annexin A1 (AC₂₋₂₆) peptide, Cis and AC₂₋₂₆+ Cis, were evaluated in the proliferation, cytotoxicity, cell migration, apoptosis, immunolocalization and gene expression assays ANXA1 and ID1, and of the ANXA1, ID1 and ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) proteins. Cervical tissue samples were analyzed histopathologically and the protein expression of ANXA1 and ID1 by immunohistochemistry. Treatments, in all groups, decreased cell proliferation and migration, without cytotoxic effects. While, Cis and AC₂₋₂₆+ Cis induced the cells to processes of late apoptosis, decreased expression of ID1 and increased ANXA1, indicating the antineoplastic activity of cisplatin. Cis and AC₂₋₂₆+ Cis administration inactivated ERK1/2 phosphorylated and induced nuclear translocation of ANXA1. Expressions of the ID1 and ANXA1 proteins were observed in tissue samples from Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN), with intense ID1 immunolabeling in CIN III. Together, the data obtained in this work provide additional understanding of the mechanism of action of cisplatin in the modulation of mediators ID1 and ANXA1 in the tumorigenic process. These

findings may outline new strategies for therapeutic intervention in cervical cancer.

Key words: SiHa line, cancer of the uterine cervix, apoptosis, ID1, nuclear translocation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018 e representação espacial das taxas ajustadas de incidência de câncer de colo de útero por 100 mil mulheres, no Brasil.....	22
Figura 2 - Modelo esquemático da história natural da infecção pelo HPV e câncer cervical.....	24
Figura 3 - Estrutura da cisplatina e adutos de DNA.....	25
Figura 4 - Estrutura da proteína Anexina A1 (ANXA1).....	29
Figura 5 - Mobilização da ANXA1 em células ativadas e seu potencial modo de ação.....	30
Figura 6 - Envolvimento da ANXA1 nuclear no câncer.....	32

Manuscrito

Figure 1. Effects of treatments with AC ₂₋₂₆ , Cis and AC ₂₋₂₆ +Cis on cell proliferation, cytotoxicity and migration.....	61
Figure 2. Cell cycle analysis and apoptosis in SiHa cells after 72h of treatments.....	62
Figure 3. Expression of ANXA1 and ID1 by Real-Time PCR and Western Blot in SiHa cells.....	63
Figure 4. Detection of the ANXA1 cell location by immunofluorescence.....	63
Figure 5. Western Blot protein expression in SiHa cells.....	64
Figure 6. Endogenous expressions of the ANXA1 and ID1 proteins in Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

‰: porcentagem

>: maior

<: menor

≤: menor ou igual

°C: graus célsius

cm²: centímetros quadrados

mg: miligrama

µg: microgramas

mM: milimolar

µM: micromolar

min: minutos

mL: mililitro

µL: microlitros

ng: nanograma

nm: nanômetro

rpm: rotação por minuto

ACTB: β-actina

ALXR/FPR2: Receptor peptídeo formil 2

ANXA1: Anexina A1; Proteína Anexina A1

AC₂₋₂₆ ou Ac2-26 : peptídeo da porção N-terminal da proteína ANXA1

BSA: Albumina Sérica Bovina

Br: Brasil

bFGF: Fator Básico de Crescimento Fibroblasto

Ca²⁺: íon cálcio

Cis: Cisplatina

cDNA: DNA complementar

CO₂: dióxido de carbono

Ct: Cycle threshold

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DEPC: água ultrapura, tratada com Dietil Pirocarbonato

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ER α : Receptor de Estrógeno Alfa

ERK1/2: Quinase Regulada Extracelularmente 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase)

(p) ERK1/2: Quinase Regulada Extracelularmente 1/2 fosforilada

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HLH: Domínio Hélice-Alça-Hélice

HPV: Papilomavirus Humano

IBILCE: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

ID1: Inibidor de ligante de DNA-1, proteína dominante negativo helix-loop-helix

IL-1 β : Interleucina 1 Beta

INCA: Instituto Nacional do Câncer

JEC: Junção Escamo Colunar

kDa: kilodalton

LDHA: lactato desidrogenase A

LOTE: tampão de diluição Tris-EDTA

Log₂: escala logarítmica de base 2

mA: miliampère

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

MAPK: Proteína-Quinases Ativadas por Mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases)

Na₃VO₄: Ortovanadato de sódio

NF-κB: Fator de crescimento nuclear kappa B

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

pb: Pares de base

PBS: Tampão Fosfato Salino

PBEA: PBS + Albumina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

PLA2: Fosfolipase A2

p65: Fator Nuclear NF-kappa-B subunidade p65

RIPA: Tampão de lise

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAi: RNA de interferência

RT: transcriptase reversa

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

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

SiHa controle (sem tratamento)

TBS: Tris-buffered Saline

TBST: Tris-buffered Saline + Tween 20

TLRs: receptores toll-like

TUBA6: Tubulina Alfa 6

Tween 20: Poliexietileno Sorbitano Monolaurato

U: unidades

UK: Reino Unido

UNESP: Universidade Estadual Paulista

UV: luz ultravioleta

V: volts

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

Δ : delta

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	36
3. MANUSCRITO	37
ABSTRACT	39
3.1. INTRODUCTION	40
3.2. RESULTS	42
3.2.1. <i>AC₂₋₂₆ and Cis decrease cell growth, migration and low cytotoxicity</i>	42
3.2.2. <i>Cis and AC₂₋₂₆ +Cis direct cells to late apoptosis and necrotic process</i>	43
3.2.3. <i>ANXA1 and ID1 Gene and protein expression are modulated by Cis and AC₂₋₂₆+Cis</i>	43
3.2.4. <i>Inhibition of phosphorylated ERK1/2 by Cis and AC₂₋₂₆ +Cis</i>	44
3.2.5. <i>Nuclear translocation of ANXA1 is induced by Cis and AC₂₋₂₆ + Cis in SiHa cells</i>	44
3.2.6. <i>Increased endogenous expression of ID1 protein in cervical biopsies</i>	44
3.3. DISCUSSION	45
3.4. MATERIALS AND METHODS	48
3.4.1. <i>Cell culture and treatment protocols</i>	48
3.4.2. <i>Growth curve and viability</i>	48
3.4.3. <i>Wound healing assay</i>	49
3.4.4. <i>Transwell migration</i>	49
3.4.5. <i>Cell cycle analysis</i>	49
3.4.6. <i>Annexin V-FITC/PI assay to analyze apoptosis</i>	50
3.4.7. <i>RNA Extraction and Reverse Transcription</i>	50
3.4.8. <i>Quantitative real-time PCR</i>	50
3.4.9. <i>Western Blot analysis</i>	51
3.4.10. <i>Immunofluorescence</i>	51
3.4.11. <i>Tissue specimens of uterine cervix</i>	51
3.4.12. <i>Immunohistochemistry and expression of ANXA1 and ID1 proteins</i>	52
3.4.13. <i>Statistical analysis</i>	52
3.5. ACKNOWLEDGMENTS	52
3.6. AUTHOR'S CONTRIBUTIONS	53
3.7. REFERENCES	53
3.8. FIGURE LEGENDS	59
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÕES	72

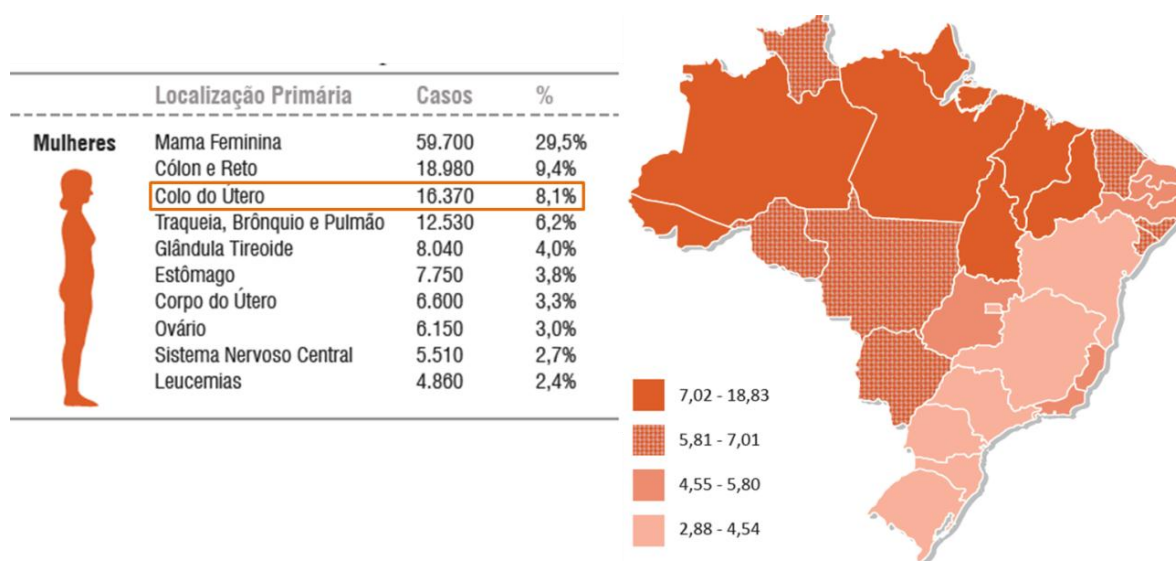
REFERÊNCIAS	74
ANEXO 1	83
ANEXO 2	114
ANEXO 3	120

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero ou cérvix é o quarto mais comum em mulheres e o sétimo mundialmente mais frequente (SMALL et al., 2017). Apresentando altas taxas de incidência e mortalidade, é um importante problema de saúde pública. A cada ano surgem cerca de 530 mil novos casos, sendo a quarta causa de morte em países em desenvolvimento, com aproximadamente 275 mil mortes por ano (FERLAY et al., 2015; TORRE et al., 2017).

No Brasil, o câncer de colo de útero ocupa a terceira posição, com a maior incidência na Região Norte (Figura 1). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostraram 16.370 novos casos, para o biênio 2018-2019, com um risco estimado de 15,43 a cada 100 mil mulheres. Aproximadamente 35% das mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo uterino têm a doença recorrente, com 90% desses achados nos três anos após o tratamento inicial (PECTASIDES et al., 2008). Assim, terapias alvo e estratégias de quimioterapias e radioterapias são essenciais para a redução da mortalidade por essa malignidade.

Figura 1 - Distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018 e representação espacial das taxas ajustadas de incidência de câncer de colo de útero por 100 mil mulheres, no Brasil



Fonte: INCA 2018 (modificado).

No câncer de cérvix o agente etiológico bem estabelecido é o Papiloma Vírus Humano (HPV) o qual pode produzir lesões papilares na ectocérvix. Os subtipos HPV16 e 18, que apresentam potencial oncogênico, são comumente identificados no câncer de colo de útero, e responsáveis mundialmente por 70-80% dos casos (LI et al., 2011; DAS et al., 2015). Estudo mostrou que após a conclusão de tratamentos com radio e quimioterapia, em câncer avançado, foi observada a persistência do HPV, correlacionando esse vírus com recidivas precoces (MAHANTSHETTY et al., 2018). Múltiplos parceiros sexuais contribuem para o risco de infecção pelo HPV, além do alto número de partos normais, contraceptivo oral e tabaco que são fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (SOTO-DE-LEON et al., 2011; CROSBIE et al., 2013; ROURA et al., 2016).

A detecção precoce desta malignidade, por meio de testes de triagem colpocitológica (Teste de Papanicolaou), monitoramento e tratamento de lesões precursoras auxiliaram para a redução de incidência e mortalidade em países desenvolvidos (GUIDO, 2017). O desenvolvimento e a introdução de vacinas em adolescentes também contribuíram efetivamente para prevenção de infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) (WALKER et al., 2017).

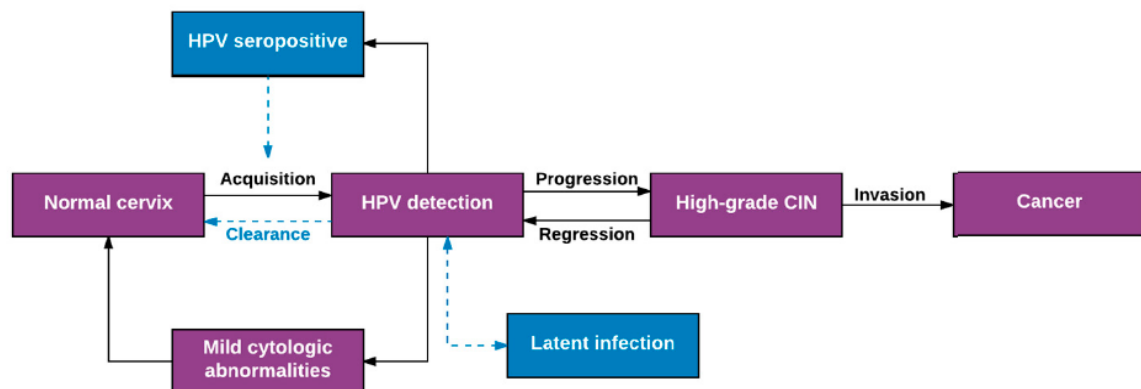
O HPV apresenta tipos de alto e baixo risco desses, 14 são considerados de alto risco (16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, 35, 59, 56, 51, 68, 39, 66), e estudos verificaram que infecções pelo HPV16, 18 ou 45 são mais propensas a evoluírem para carcinoma escamoso celular de cérvix uterina do que os outros tipos (CLIFFORD et al., 2003; ROBADI; PHARAON; DUCATMAN, 2018).

A infecção pelo HPV pode sofrer regressão naturalmente, porém a persistência de HPV de alto risco pode levar ao desenvolvimento de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) e câncer de colo uterino (Figura 2) (GRAVITT; WINER, 2017).

O câncer cervical é precedido por alterações na zona de transformação e na Junção Escamo Colunar (JEC) denominadas Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) com três graus de severidade e diretamente relacionadas à

proporção de células atípicas substituindo o epitélio cervical. NIC I é considerado uma displasia, com células atípicas restritas ao terço inferior do epitélio. NIC II apresenta displasia moderada, com células atípicas e inúmeras figuras de mitose ocupando a metade inferior do epitélio. A displasia grave e carcinoma in situ (NIC III) mostra a presença de células atípicas em todo o epitélio espessado, com um mínimo de diferenciação e maturação na superfície. Nesse estágio pode haver amplificação da alteração ao longo dos canais das criptas endocervicais e focos de microinvasões, além de elementos mitóticos e mitoses anormais presentes em todas as camadas. NIC I representa baixo risco de evolução para carcinoma, enquanto NIC II e NIC III estão associados com alto risco de desenvolvimento, sendo um importante precursor da malignidade invasiva (BASU et al., 2018).

Figura 2 - Modelo esquemático da história natural da infecção pelo HPV e câncer cervical.



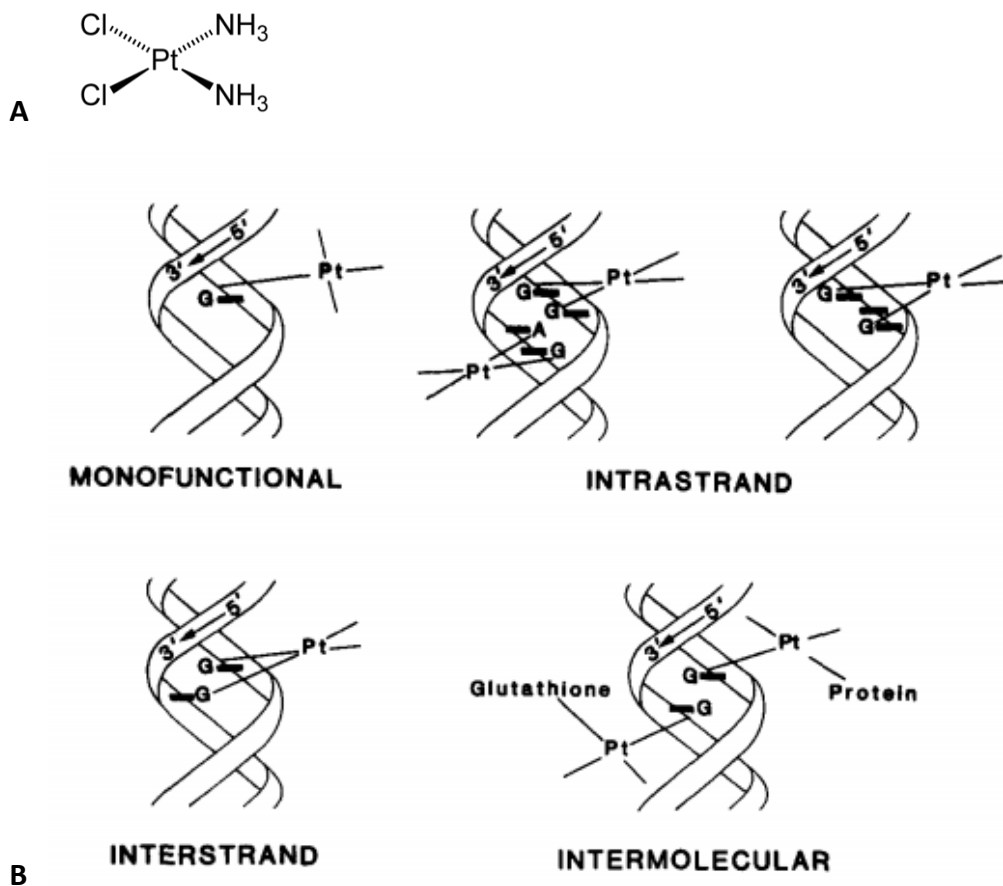
Fonte: GRAVITT; WINER, 2017. Em roxo, parâmetros que representam o modelo da história natural e em azul, as incertezas.

Atualmente, o tratamento para lesões pré-malignas inclui técnicas de crioterapia, termo coagulação, procedimentos cirúrgicos, como conização e histerectomia, e o câncer de colo uterino é tratado com cirurgia seguido de quimioterapia e radioterapia, ou ambos (BASU et al., 2018). O quimioterápico

Cisplatina (cis-diaminodichloroplatina II ou cis-DDP) foi aprovado pela FDA (American Food and Drug Administration) em 1979, e é amplamente utilizado como recurso terapêutico no câncer (SHERMAN; SUZANNE E.; LIPPARD, 1987).

Quimicamente, a cisplatina é composta por um átomo central de platina circundado por átomos de amônia e cloro em posição cis (Figura 3A), e se liga ao DNA na base purina na posição N7 para formar ligações inter e intra-fita, podendo formar ainda aduto monofuncional ou se ligar a uma proteína (Figura 3B) (SHERMAN; SUZANNE E.;LIPPARD, 1987; JAMIESON; LIPPARD, 1999).

Figura 3 - Estrura da cisplatina e adutos de DNA.



Fonte: EASTMAN, 1987. [A] Representação química da estrutura da cisplatina. [B] Estruturas de adutos no DNA formadas pela cisplatina.

A ligação mais prevalente intra-fita ocorre em GG (65%), GA (25-30%) e GNG (1-3%) (EASTMAN, 1987; CHANEY et al., 2005). A atividade antineoplásica da cisplatina tem como alvo principal o DNA celular, onde induz a formação de adutos que posteriormente interferem na transcrição e replicação desencadeando o processo de apoptose (SUO;LIPPARD;JOHNSON, 1999; LI et al., 2014; LI et al., 2015). No entanto, essa droga pode interagir com diferentes componentes celulares como fosfolipídeos e RNA (WANG; LU; LI, 1996; HOSTETTER; OSBORN; DEROSE, 2012). Os efeitos celulares que envolvem esse quimioterápico revela sua ação sobre diversas vias de sinalizações (p53 e folato) e processos epigenéticos (modificações de histonas) (SIDDIK, 2003; LICONA et al., 2017).

Estudos apontam resultados importantes no tratamento do carcinoma de cérvix como a associação da cisplatina a outras drogas, tais como a Gencitabina (HASHEMI et al., 2013), Paclitaxel (CHENG et al., 2014) ou agentes hormonais (SEGOVIA-MENDOZA et al., 2015). No estágio inicial do tumor de cérvix foi confirmada a eficácia da cisplatina em controlar ou retardar o crescimento tumoral (SUPRASERT et al., 2007). No entanto, esse quimioterápico pode induzir gastrotoxicidade, mielossupressão, neuropatia, reações alérgicas e, principalmente, nefrotoxicidade (OH et al., 2014; YANAGIMOTO et al., 2016).

Várias alterações genéticas e epigenéticas ocorrem durante o processo de tumorigênese do colo de útero (STEENBERGEN et al., 2014; LI et al., 2017b). Entre essas, destacamos a metilação da região promotora de genes supressores de tumor que favorecem o seu silenciamento e resultam na carcinogênese de cérvix (ZHANG et al., 2011, 2012). Além disso, os oncogenes E6 e E7 codificam proteínas multifuncionais que inativam os supressores tumorais, p53 e pRb, respectivamente (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). Essa instabilidade no genoma desencadeia o bloqueio do ciclo celular e desregulação dos checkpoints devido a perda dos supressores tumorais, ocasionando o processo tumorigênico (INCASSATI et al., 2006). Proteínas E7 do HPV de alto risco (16, 18 e 31) tem maior afinidade pela

proteína Rb, inativam CDK1 p21 e p27 e se ligam ativando as ciclinas E e A. Enquanto as proteínas E6 de HPV de alto risco tem afinidade maior pela proteína p53. Essa interação E6-p53 direciona os polimorfismos e os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de cólo de útero, uma vez que, o p53 é polimórfico na posição 72 e a variante Arg72 é bem mais susceptível à degradação pelo E6 (ROBBINS e COTRAN, 2010).

O colo uterino é altamente sensível ao hormônio estrógeno e, durante o ciclo menstrual, as células epiteliais proliferam e se diferenciam à medida que os níveis desse hormônio aumentam, resultando em epitélio hiperplásico sem mudanças patológicas. No entanto, uma contínua estimulação hormonal pode levar à neoplasia, pois há evidências de que o Receptor de Estrógeno Alfa (ER α) é necessário para o desenvolvimento e manutenção tumoral em associação à infecção pelo HPV de alto risco (CHUNG et al., 2013; RAMACHANDRAN, 2017).

A carcinogênese de colo de útero também está relacionada com processos de angiogênese e inflamatórios. A angiogênese ocorre em tumores que secretam mediadores tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) e fator básico de crescimento fibroblasto (bFGF) (SALGADO et al., 2004). A via do VEGF regula a angiogênese e, portanto, é alvo de terapias dirigidas, apresentando resultados satisfatórios com efeitos anti-angiogênicos (WANG et al., 2015). A presença de infiltrado inflamatório é de suma importância no processo de neovascularização. Uma vez que os tumores recrutam células hematopoiéticas, em especial os monócitos, que compõem a massa tumoral e parecem estar diretamente envolvidos na progressão e metástase (CONDEELIS; POLLARD, 2006).

O influxo de células inflamatórias é uma característica do microambiente tumoral, sendo esse aspecto muito discutido na progressão neoplásica (ZIJLMANS et al., 2009). Componentes celulares e humorais apresentam impacto na iniciação e progressão tumoral, evidenciado pela inflamação envolvida na tumorigênese e frequentes de áreas de inflamação crônica, como observado na associação da pancreatite crônica e colite ulcerativa e o surgimento de tumor no pâncreas e intestino, respectivamente (CLEVERS,

2004; FARROW et al., 2004; GALDIERO; MARONE; MANTOVANI, 2017). A infiltração de células do sistema imunológico e mediadores liberados também constituem as principais razões para mudanças pró-inflamatórias no microambiente do colo uterino (BERTI et al., 2017) e próstata (THAPA; GHOSH, 2015), contribuindo para o desenvolvimento do câncer.

No início do processo neoplásico, as células inflamatórias e os fatores produzidos regulam o crescimento, a migração e a diferenciação de todos os tipos celulares no microambiente tumoral, incluindo as células neoplásicas, endoteliais e fibroblastos. Posteriormente, as células neoplásicas utilizam alguns mecanismos inflamatórios para invasão de outros tecidos, como adesão celular ao endotélio vascular, migração e diapedese. Perretti (1997) já havia destacado a semelhança da metastatização com esses estágios do processo inflamatório.

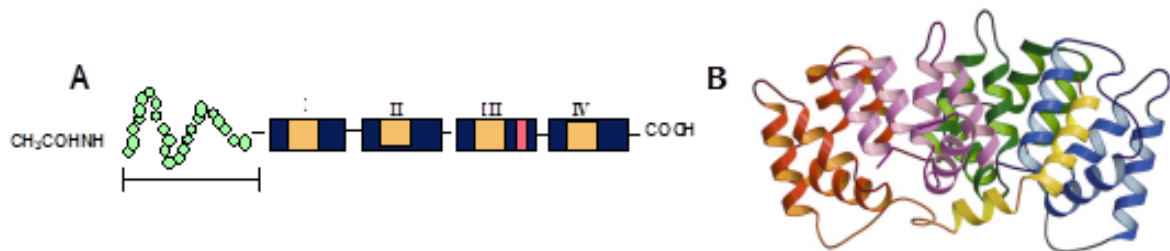
As células inflamatórias secretam numerosas citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que estimulam a proliferação, inibem a apoptose, induzem a morfogênese e geram espécies reativas de oxigênio capazes de lesar o DNA (COUSSENS; WERB, 2002). Em consequência, promovem um ambiente propício para o processo neoplásico, facilitando a instabilidade genômica (RONNOV-JESSEN; PETERSEN; BISSELL, 1996; TLSTY; HEIN, 2001; GASHI et al., 2018).

A prevenção de danos teciduais e manutenção da homeostasia é controlada por mediadores anti-inflamatórios, dentre estes destacamos a Anexina A1 (ANXA1), uma proteína de 37 kDa, que age como modulador da inflamação (CHOUTHURY; FLOWER, 1988; SILISTINO-SOUZA et al., 2007; COSTA et al., 2018). Dessa forma, o estudo do envolvimento dessa proteína no carcinoma de cérvix pode ser útil na caracterização do desenvolvimento tumoral.

A ANXA1 (Figura 4) foi o primeiro membro caracterizado de uma superfamília de proteínas que se ligam aos fosfolipídios de forma dependente de cálcio (RESCHER; GERKE, 2004). Essa proteína foi inicialmente denominada lipocortina pelo fato de mimetizar a ação anti-inflamatória dos

glicocorticóides, por meio da inibição da síntese de eicosanóides e fosfolipase A2 (PLA2), afetando dessa forma componentes da reação inflamatória e liberação do ácido araquidônico (FLOWER, 1988; PERRETTI; GAVINS, 2003).

Figura 4 - Estrutura da proteína Anexina A1 (ANXA1).



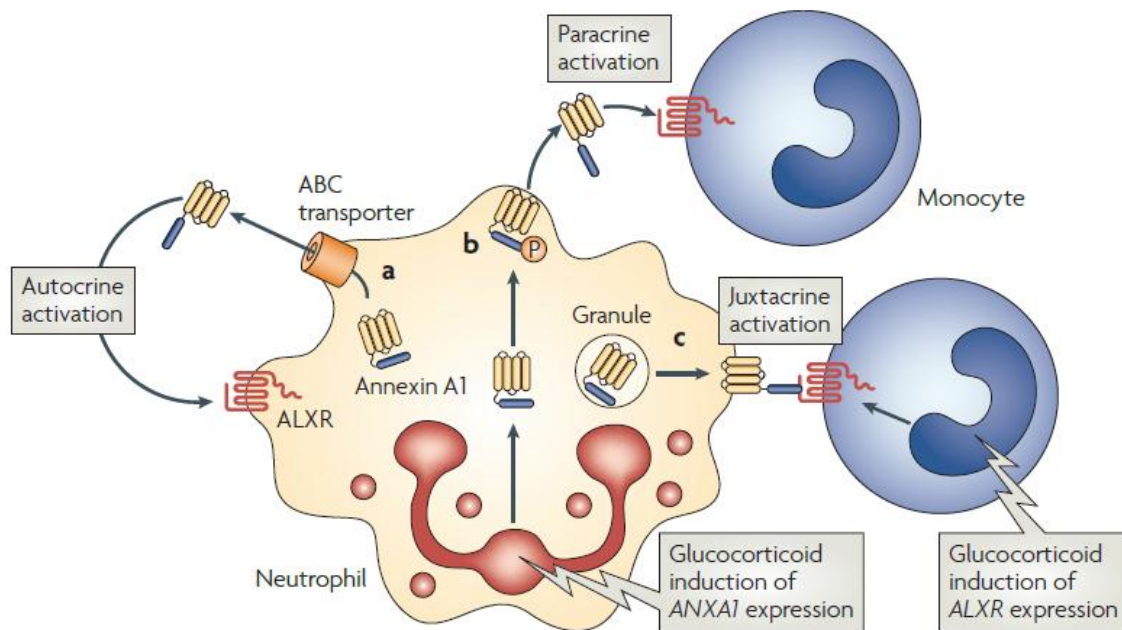
Fonte: RESCHER; GERKE, 2004. [A] Representação esquemática da estrutura primária, com destaque da região ativa N-terminal. [B] Ilustração do arranjo tridimensional dessa proteína.

A ANXA1 é capaz de se ligar a fosfolípeos carregados negativamente de maneira dependente de cálcio (Ca^{2+}) e apresenta uma estrutura conservada de cerca de 70 aminoácidos repetidos. Esta ligação é reversível e a remoção de Ca^{2+} , por agentes alquilantes, conduz a liberação de anexinas a partir da matriz de fosfolípeos (GERKE; MOSS, 2002). Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios: uma pequena região N-terminal, variando em comprimento e composição, e um domínio central, região C-terminal, formado por quatro a oito dobras repetidas de uma sequência conservada de 70 a 80 aminoácidos (RESCHER; GERKE, 2004). O domínio N-terminal é específico para cada membro dessa família e interage com diferentes ligantes, enquanto a região C-terminal é responsável pela afinidade ao cálcio, e consequente ligação aos fosfolípidos.

ANXA1 apresenta ações anti e pró-inflamatórias e está envolvida em diversas vias de sinalização, sendo liberada endogenamente de maneira autócrina e parácrina (Figura 5) (PERRETTI; D'AQUISTO, 2009). As propriedades dessa proteína foram avaliadas em modelos experimentais de

inflamação aguda, crônica e sistêmica (DAMAZO et al., 2006; GIL et al., 2006; GASTARDELO et al., 2009; GIROL et al., 2013; MOLÁS et al., 2017).

Figura 5 - Mobilização da ANXA1 em células ativadas e seu potencial modo de ação.



Fonte: PERRETI; D'AQUISTO, 2009. Após a ativação celular, através da adesão a monocamadas de células endoteliais, a anexina A1 intracelular é mobilizada para a membrana plasmática. Dependendo do tipo de célula, a anexina A1 é então externalizada e/ou secretada através de um dos três mecanismos: (a) através da ativação do transportador (ABC) de ligação ao ATP; (b) através da fosforilação dos resíduos de serina amino-terminal 27 seguido pela localização da membrana em domínios lipídicos específicos antes de se deslocar para o folheto externo da membrana plasmática e ser secretada; (c) ou através da fusão de grânulos contendo anexina A1 com a membrana plasmática, seguida da liberação de anexina A1. Na presença de $Ca^{2+} \geq 1$ mM, a anexina A1 extracelular sofre mudança conformacional que leva à exposição da região N-terminal e liga ao seu receptor ALXR (conhecido como FPR2). A anexina A1 pode funcionar de maneira autócrina, parácrina e justácrina (envolvendo o contato célula-célula) para ativar a sinalização ALXR. A via da anexina A1 – ALXR pode ser manipulada por glicocorticoides, que induzem a expressão do gene que codifica a anexina A1 (ANXA1) e o ALXR por células imunes inatas, aumentando os efeitos desse circuito antiinflamatório.

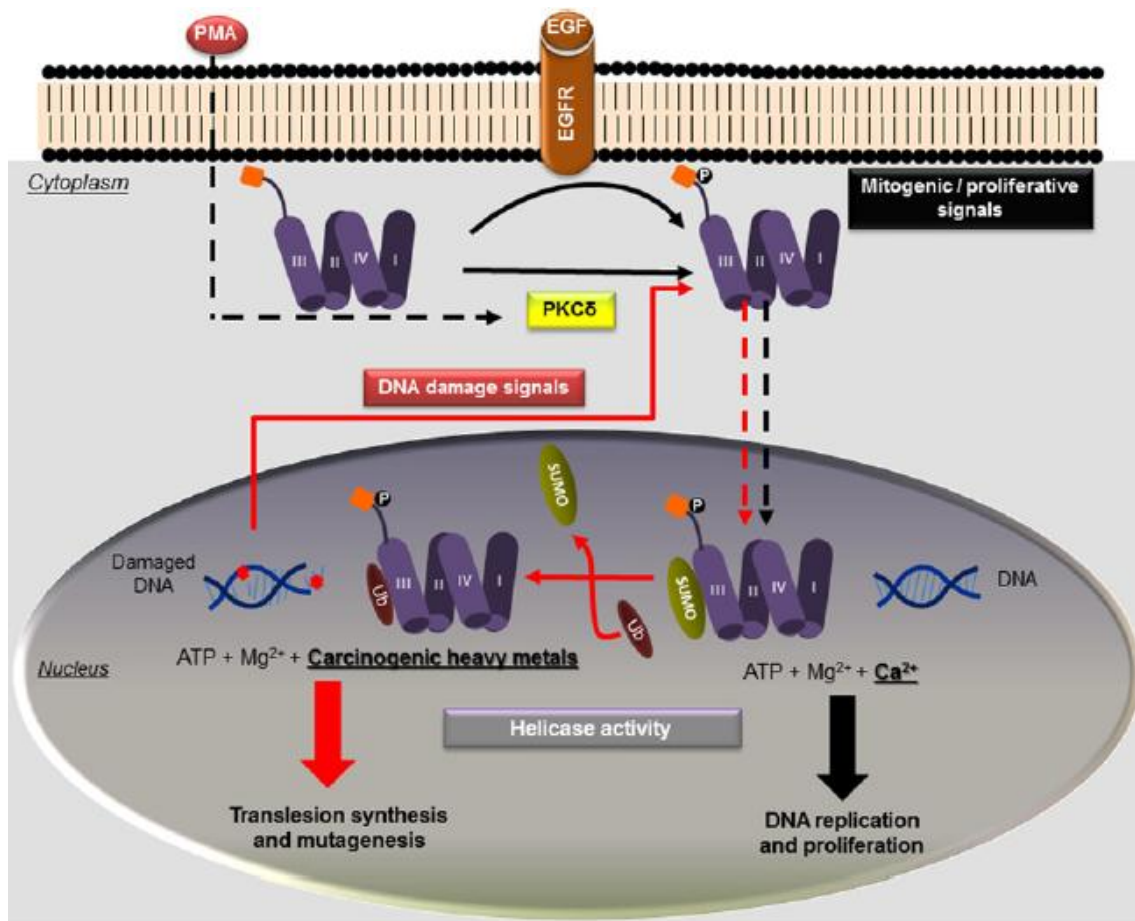
Na artrite inflamatória, estudo com microvesículas de neutrófilos mostrou que a ANXA1, direcionada aos condrócitos pelo receptor FPR2/ALX, eleva a deposição da matriz extracelular e diminui a degradação da cartilagem (HEADLAND et al., 2015). Por outro lado, na doença pulmonar obstrutiva crônica, a superexpressão da ANXA1 foi associada à obstrução do fluxo aéreo, por afetar a função dos fibroblastos pulmonares (LAI et al., 2018).

Além dos efeitos anti-inflamatórios, a ANXA1 tem papel na proliferação, diferenciação celular e apoptose (RESCHER; GERKE, 2004; LIM; PERVAIZ, 2007; CARDIN, 2017), indicando sua relação com a tumorigênese. No entanto, esse papel ainda não está totalmente esclarecido, pois sua expressão ocorre de maneira diferente, dependendo do tipo do tumor. A desregulação da ANXA1 está associada com a progressão e o desenvolvimento tumoral em vários tipos de câncer (GUO; LIU; SUN, 2013; JORGE et al., 2013), exercendo efeito sobre a proliferação e invasão de células tumorais (HAN et al., 2017).

Estudo em câncer de cabeça e pescoço mostra baixa expressão de ANXA1 em amostras teciduais de carcinoma de laringe, no entanto, a administração do peptídeo da AC₂₋₂₆ que confere ação biológica através do receptor FPR2/ALX, inibiu o crescimento de células Hep-2 (GASTARDELO et al., 2014). Diferentemente, a superexpressão dessa proteína foi detectada em câncer hepático (LIN et al., 2014) e de mama (SOBRAL-LEITE et al., 2015; OKANO et al., 2015). Interessantemente, em carcinoma esofágico há perda da ANXA1 (PAWELETZ et al., 2000; YAZDIAN-ROBATI et al., 2017), enquanto o adenocarcinoma de esôfago apresenta expressão elevada dessa proteína e esse aumento correlaciona com estágios avançados do tumor e metástases (WANG et al., 2006).

A ANXA1 é encontrada na membrana plasmática, citoplasma, associada às organelas e no núcleo (RESCHER; ZOBIAK; GERKE, 2000; MUSSUNOOR; MURRAY, 2008). A presença dessa proteína no compartimento nuclear está relacionada com o desenvolvimento tumoral (Figura 6), e sua translocação do citoplasma para o núcleo ocorre por danos no DNA, estímulos proliferativos e associados à fosforilação (BOUDHRAA et al., 2016).

Figura 6 - Envolvimento da ANXA1 nuclear no câncer.



Fonte: BOUDHRAA et al., 2016. A translocação do ANXA1 do citoplasma para o núcleo é iniciada por sinais mitogênicos/proliferativos (setas pretas) ou após danos no DNA (setas vermelhas). O tratamento com PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) induz a ativação de PKC δ (proteína quinase C), que permite a fosforilação de ANXA1 e sua realocação ao núcleo. Da mesma forma, a ativação do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) pelo seu ligante cognato (EGF) induz a fosforilação (do resíduo Tyr21) e a translocação nuclear de ANXA1. Uma vez no núcleo, ANXA1 é saturada (dentro de sua terceira repetição em Lys257) e estimula a replicação do DNA através da sua atividade helicase (setas pretas). Após o dano ao DNA, a ANXA1 é translocada do citoplasma para o núcleo, onde é monoubiquitizada. Pela atividade de helicase e presença de metais pesados (As^{3+} e Cr^{6+}), a ANXA1 monoubiquitizada permite a síntese da translesão e a mutagenese (setas vermelhas).

Estudos apontam que a ANXA1 modula a expressão de algumas vias gênicas, como por exemplo, o gene Inibidor de diferenciação ou Ligação ao DNA 1 (ID1) (PRATES et al., 2015), sendo esse gene indicado como um

oncogene, pois atua na iniciação e progressão tumoral (LASORELLA; UO; IAVARONE, 2001; LI et al., 2017a).

ID1 não é um fator de transcrição, mas um regulador transcricional de genes alvos que controla negativamente o domínio hélice-alça-hélice (HLH) (ZHENG et al., 2004). Apresenta superexpressão em diversos tumores sólidos (RUZINOVA; BENEZRA, 2003), correlacionando resistência à tratamentos, mau prognóstico e metástase (SCHINDL et al., 2001, 2003). A família de proteínas ID é um grupo de pequenas moléculas de curto comprimento (13 a 20 KDa), que pertence a família de fatores de transcrição HLH pelo qual inibe os fatores de transcrição básica de ligação ao DNA. Em mamíferos, esse grupo apresenta quatro subtipos (ID1-4) que participam de vários processos celulares (BENEZRA et al., 1990; PERK; IAVARONE; BENEZRA, 2005).

As regiões N-terminal e HLH do ID1 são responsáveis por causar deformidades no centrossomo e centríolo, contribuindo para a instabilidade genômica e iniciação de tumores. Essa confirmação se deu ao analisar várias células tumorais, incluindo linhagens de carcinoma cervical (SiHa, HeLa, CaSki e A33A), com elevado nível de expressão endógena de ID1 (MANTHEY et al., 2010).

Investigações têm sugerido que os HPVs de alto risco contribuem para a progressão tumoral pela regulação de ID1, em câncer de cérvix (DARNEL et al., 2010), e que níveis de expressão desse gene estão relacionados com processos de angiogênese, diferenciação e metástase.

Nos tumores de pâncreas (LEE et al., 2004) e esofágico de células escamosas (LUO et al., 2012) foram observadas superexpressões do ID1 relacionada com o processo de angiogênese, com alta densidade de vasos intratumorais. Alto nível de ID1 foi detectado em câncer de próstata, sugerindo participação no desenvolvimento e progressão do tumor, assim como prognóstico ruim e baixa sobrevida (OUYANGE et al., 2002; PONZ-SARVISÉ et al., 2014).

Com essas considerações, estratégias para entender a expressão da ANXA1 e ID1 em amostras teciduais de cérvix e relacionar os efeitos da

administração da cisplatina em associação com o peptídeo da ANXA1 nas células tumorais, nossos estudos podem representar um grande avanço no entendimento funcional e molecular da regulação gênica no câncer de colo de útero.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas células SiHa controle e tratadas com peptídeo AC₂₋₂₆, cisplatina (Cis) e associação peptídeo e cisplatina (AC₂₋₂₆+Cis), permitem concluir:

1. A proliferação e migração celular são reduzidas após os tratamentos e não são citotóxicos.

2. Os tratamentos com Cis e AC₂₋₂₆+Cis induzem as células à apoptose e necrose celular.

3. As expressões dos genes ANXA1 e ID1 e respectivas proteínas são moduladas após tratamentos Cis e AC₂₋₂₆+Cis.

4. A fosforilação de ERK1/2 é inibida após os tratamentos Cis e AC₂₋₂₆+Cis.

5. A localização intracelular de ANXA1 é citoplasmática em todos os tratamentos, e com positividade nuclear após Cis e AC₂₋₂₆+Cis.

6. As amostras teciduais, obtidas de biópsias de pacientes nos diferentes graus evolutivos de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), apresentam elevada expressão de ID1 em NIC III.

Associadas, essas conclusões mostram que a ANXA1 e o ID1 são mediadores importantes no desenvolvimento tumoral e o tratamento com o quimioterápico Cisplatina atua modulando esses mediadores. Desse modo, nossos resultados podem direcionar terapias inovadoras no tratamento de câncer de colo uterino.

REFERÊNCIAS

- BASU, P. et al. Management of cervical premalignant lesions. Current problems in cancer, 11 Jan. 2018.
- BENEZRA, R. et al. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Cell, v. 61, n. 1, p. 49–59, 6 Apr. 1990.
- BERTI, F. C. B. et al. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. Cytokine & Growth Factor Reviews, v. 34, p. 1–13, Apr. 2017.
- BOUDHRAA, Z. et al. Annexin A1 localization and its relevance to cancer. Clinical science (London, England: 1979), v. 130, n. 4, p. 205–20, 14 Feb. 2016.
- CARDIN, L. T. Ação do peptídeo ANXA1 Ac2-26 in vitro: interação com meio condicionado de células endoteliais em carcinoma de colo de útero. [s.l.] Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 2017.
- CHANEY, S. G. et al. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 53, n. 1, p. 3–11, Jan. 2005.
- CHENG, Y.-J. et al. High Id1 expression, a generally negative prognostic factor, paradoxically predicts a favorable prognosis for adjuvant paclitaxel plus cisplatin therapy in surgically treated lung cancer patients. Oncotarget, v. 5, n. 22, p. 11564–75, 30 Nov. 2014.
- CHUNG, S.-H. et al. Requirement for Stromal Estrogen Receptor Alpha in Cervical Neoplasia. Hormones and Cancer, v. 4, n. 1, p. 50–59, 13 Feb. 2013.
- CLEVERS, H. At the crossroads of inflammation and cancer. Cell, v. 118, n. 6, p. 671–4, 17 Sep. 2004.
- CLIFFORD, G. M. et al. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. British journal of cancer, v. 89, n. 1, p. 101–5, 7 Jul. 2003
- CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. Cell, v. 124, n. 2, p. 263–266, 27 Jan. 2006.
- COSTA, M. B. et al. Mast cell heterogeneity and anti-inflammatory annexin A1 expression in leprosy skin lesions. Microbial pathogenesis, v. 118, p. 277–284, 29 Mar. 2018.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. Nature, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 19 Dec. 2002.

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, v. 382, n. 9895, p. 889–899, 7 Sep. 2013.

CROXTALL, J. D.; CHOUDHURY, Q.; FLOWER, R. J. Inhibitory effect of peptides derived from the N-terminus of lipocortin 1 on arachidonic acid release and proliferation in the A549 cell line: identification of E-Q-E-Y-V as a crucial component. *British journal of pharmacology*, v. 123, n. 5, p. 975–83, Mar. 1998.

DAMAZO, A. S. et al. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 176, n. 7, p. 4410–8, 1 Apr. 2006.

DARNEL, A. D. et al. Correlation between the presence of high-risk human papillomaviruses and Id gene expression in Syrian women with cervical cancer. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 16, n. 3, p. 262–6, Mar. 2010.

DAS, P. et al. Human papillomavirus (HPV) genome status & cervical cancer outcome--A retrospective study. *The Indian journal of medical research*, v. 142, n. 5, p. 525–32, Nov. 2015.

EASTMAN, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & therapeutics*, v. 34, n. 2, p. 155–66, 1987.

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

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, v. 136, n. 5, p. E359-86, 1 Mar. 2015.

FLOWER, R. J. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *British journal of pharmacology*, v. 94, n. 4, p. 987–1015, Aug. 1988.

GALDIERO, M. R.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, p. a028662, 4 Aug. 2017.

GASHI, G. et al. The association between micronucleus, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds frequency and the degree of uterine cervical lesions. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, p. 1–9, 31 Jan. 2018.

GASTARDELO, T. S. et al. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. *The American journal of pathology*, v. 174, n. 1, p. 177–83, Jan. 2009.

GASTARDELO, T. 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*, v. 9, n. 12, p. e111317, 9 Dec. 2014.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. *Physiological reviews*, v. 82, n. 2, p. 331–71, Apr. 2002.

GIL, C. D. et al. Interaction of human neutrophils with endothelial cells regulates the expression of endogenous proteins annexin 1, galectin-1 and galectin-3. *Cell biology international*, v. 30, n. 4, p. 338–44, Apr. 2006.

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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 190, n. 11, p. 5689–701, 1 Jun. 2013.

GRAVITT, P. E.; WINER, R. L. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses*, v. 9, n. 10, 2017.

GUIDO, R. Cervical Cancer Screening. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 61, n. 1, p. 1, Dec. 2017.

GUO, C.; LIU, S.; SUN, M.-Z. Potential role of Anxa1 in cancer. *Future oncology (London, England)*, v. 9, n. 11, p. 1773–93, Nov. 2013.

HAN, G. et al. Effect of Annexin A1 gene on the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells and its regulatory mechanisms. *International journal of molecular medicine*, v. 39, n. 2, p. 357–363, Feb. 2017.

HASHEMI, F. A. et al. Concurrent chemoradiation with weekly gemcitabine and cisplatin for locally advanced cervical cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 14, n. 9, p. 5385–9, 2013.

HEADLAND, S. E. et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Science Translational Medicine*, v. 7, n. 315, p. 315ra190-315ra190, 25 Nov. 2015.

HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DEROSE, V. J. RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS chemical biology*, v. 7, n. 1, p. 218–25, 20 Jan. 2012.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. p. 128, 2018.

INCASSATI, A.; PATEL, D.; MCCANCE, D. J. Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. *Oncogene*, v. 25, n. 17, p. 2444–51, 20 Apr. 2006.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical reviews*, v. 99, n. 9, p. 2467–98, 8 Sep. 1999.

JORGE, Y. C. et al. Expression of annexin-A1 and galectin-1 anti-inflammatory proteins and mRNA in chronic gastritis and gastric cancer. *Mediators of inflammation*, v. 2013, p. 152860, 2013.

LAI, T. et al. Annexin A1 is elevated in patients with COPD and affects lung fibroblast function. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, v. 13, p. 473–486, Feb. 2018.

LASORELLA, A.; UO, T.; IAVARONE, A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene*, v. 20, n. 58, p. 8326–33, 20 Dec. 2001.

LEE, K. T. et al. Overexpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers. *British Journal of Cancer*, v. 90, n. 6, p. 1198–1203, 24 Mar. 2004.

LI, L. et al. siRNA-mediated knockdown of ID1 disrupts Nanog- and Oct-4-mediated cancer stem cell-likeness and resistance to chemotherapy in gastric cancer cells. *Oncology Letters*, v. 13, n. 5, p. 3014–3024, May 2017a.

LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International journal of cancer*, v. 128, n. 4, p. 927–35, 15 Feb. 2011.

LI, Q. et al. The effect of lipocisplatin on cisplatin efficacy and nephrotoxicity in malignant breast cancer treatment. *Biomaterials*, v. 35, n. 24, p. 6462–72, Aug. 2014.

LI, R.-N. et al. Promoter methylation status of the tumor suppressor genes p16 and cadherin 1 in cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology letters*, v. 13, n. 6, p. 4397–4401, Jun. 2017b.

LI, Y. et al. P16INK4A is required for cisplatin resistance in cervical carcinoma SiHa cells. *Oncology letters*, v. 9, n. 3, p. 1104–1108, Mar. 2015.

LICONA, C. et al. A ruthenium anticancer compound interacts with histones and impacts differently on epigenetic and death pathways compared to cisplatin. *Oncotarget*, v. 8, n. 2, p. 2568–2584, 10 Jan. 2017.

LIM, L. H. K.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 21, n. 4, p. 968–75, Apr. 2007.

LIN, Y. et al. Increased expression of annexin A1 predicts poor prognosis in human hepatocellular carcinoma and enhances cell malignant phenotype. *Medical Oncology*, v. 31, n. 12, p. 327, 21 Dec. 2014.

LUO, K.-J. et al. Prognostic relevance of Id-1 expression in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. *The Annals of thoracic surgery*, v. 93, n. 5, p. 1682–8, May 2012.

MAHANTSHETTY, U. et al. Impact of HPV 16/18 infection on clinical outcomes in locally advanced cervical cancers treated with radical radio (chemo) therapy - A prospective observational study. *Gynecologic oncology*, v. 148, n. 2, p. 299–304, Feb. 2018.

MANTHEY, C. et al. Elevated endogenous expression of the dominant negative basic helix-loop-helix protein ID1 correlates with significant centrosome abnormalities in human tumor cells. *BMC cell biology*, v. 11, p. 2, 14 Jan. 2010.

MOLÁS, R. B. et al. Ac 2-26 peptide and serine protease of *Bothrops atrox* similarly induces angiogenesis without triggering local and systemic inflammation in a murine model of dorsal skinfold chamber. *Toxicon*, v. 137, p. 7–14, Oct. 2017.

MUSSUNOOR, S.; MURRAY, G. The role of annexins in tumour development and progression. *The Journal of Pathology*, v. 216, n. 2, p. 131–140, Oct. 2008.

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

OH, G.-S. et al. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte & blood pressure : E & BP*, v. 12, n. 2, p. 55–65, Dec. 2014.

OKANO, M. et al. Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer. *Oncology reports*, v. 33, n. 3, p. 1064–70, Mar. 2015.

OUYANG, X. S. et al. Over expression of ID-1 in prostate cancer. *The Journal of urology*, v. 167, n. 6, p. 2598–602, Jun. 2002.

PECTASIDES, D. et al. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treatment Reviews*, v. 34, n. 7, p. 603–613, Nov. 2008.

PERK, J.; IAVARONE, A.; BENEZRA, R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 8, p. 603–614, 20 Aug. 2005.

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. *Trends in pharmacological sciences*, v. 18, n. 11, p. 418–25, Nov. 1997.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology*, v. 9, n. 1, p. 62–70, 1 Jan. 2009.

PERRETTI, M.; GAVINS, F. N. E. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, v. 18, p. 60–4, Apr. 2003.

PONZ-SARVISÉ, M. et al. Differential tumor expression of inhibitor of differentiation-1 in prostate cancer patients with extreme clinical phenotypes and prognostic implications. *Clinical genitourinary cancer*, v. 12, n. 2, p. 87–93, Apr. 2014.

PRATES, J. et al. ANXA1Ac₂₋₂₆ peptide reduces ID1 expression in cervical carcinoma cultures. *Gene*, v. 570, n. 2, p. 248–54, 10 Oct. 2015.

RAMACHANDRAN, B. Functional association of oestrogen receptors with HPV infection in cervical carcinogenesis. *Endocrine-related cancer*, v. 24, n. 4, p. R99–R108, 10 Apr. 2017.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *Journal of Cell Science*, v. 117, n. 13, p. 2631–2639, 1 Jun. 2004.

RESCHER, U.; ZOBIAK, N.; GERKE, V. Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *Journal of cell science*, v. 113 (Pt 22), p. 3931–8, Nov. 2000.

ROBADI, I. A.; PHARAON, M.; DUCATMAN, B. S. The Importance of High-Risk Human Papillomavirus Types Other Than 16 and 18 in Cervical Neoplasia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 142, n. 6, p. 693–695, Jun. 2018.

ROBBINS E COTRAN. Bases patológicas das doenças / Vinay Kumar et al; [tradução de Patrícia Dias Fernandes et al]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

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

ROURA, E. et al. Correction: The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PLOS ONE*, v. 11, n. 3, p. e0151427, 8 Mar. 2016.

RUZINOVA, M. B.; BENEZRA, R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends in cell biology*, v. 13, n. 8, p. 410–8, Aug. 2003.

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

SCHINDL, M. et al. Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. *Cancer research*, v. 61, n. 15, p. 5703–6, 1 Aug. 2001.

SCHINDL, M. et al. Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clinical cancer research: an official*

- journal of the American Association for Cancer Research, v. 9, n. 2, p. 779–85, Feb. 2003.
- SEGOVIA-MENDOZA, M. et al. Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study. *BMC cancer*, v. 15, n. 1, p. 21, 27 Jan. 2015.
- SHERMAN, SUZANNE E.; LIPPARD, S. J. Structural Aspects of Platinum Anticancer Drug Interactions with DNA. *Chemical reviews*, v. 87, n. 5, p. 1153–1181, 1987.
- SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, v. 22, n. 47, p. 7265–7279, 23 Oct. 2003.
- SILISTINO-SOUZA, R. et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *International journal of cancer*, v. 120, n. 12, p. 2582–9, 15 Jun. 2007.
- SMALL, W. et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 1 Jul. 2017.
- SOBRAL-LEITE, M. et al. Annexin A1 expression in a pooled breast cancer series: association with tumor subtypes and prognosis. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 156, 2 Dec. 2015.
- SOTO-DE LEON, S. et al. Distribution Patterns of Infection with Multiple Types of Human Papillomaviruses and Their Association with Risk Factors. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, p. e14705, 17 Feb. 2011.
- STEENBERGEN, R. D. M. et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nature Reviews Cancer*, v. 14, n. 6, p. 395–405, 1 Jun. 2014.
- SUO, Z.; LIPPARD, S. J.; JOHNSON, K. A. Single d(GpG)/cis-diammineplatinum(II) adduct-induced inhibition of DNA polymerization. *Biochemistry*, v. 38, n. 2, p. 715–26, 12 Jan. 1999.
- SUPRASERT, P. et al. Efficacy of cisplatin in early stage cervical cancer with a long waiting period for surgery. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 8, n. 1, p. 51–4, 2007.
- THAPA, D.; GHOSH, R. Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression. *Biochemical pharmacology*, v. 94, n. 2, p. 53–62, 15 Mar. 2015.
- TLSTY, T. D.; HEIN, P. W. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Current opinion in genetics & development*, v. 11, n. 1, p. 54–9, Feb. 2001.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 26, n. 4, p. 444–457, Apr. 2017.

WALKER, T. Y. et al. National, Regional, State, and Selected Local Area Vaccination Coverage Among Adolescents Aged 13-17 Years - United States, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 66, n. 33, p. 874–882, 25 Aug. 2017.

WANG, K. L. et al. Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 12, n. 15, p. 4598–604, 1 Aug. 2006.

WANG, K.; LU, J.; LI, R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 151, p. 53–88, Jun. 1996.

WANG, Z. et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Seminars in Cancer Biology*, v. 35, p. S224–S243, Dec. 2015.

YANAGIMOTO, Y. et al. Improvement of cisplatin-related renal dysfunction by synthetic ghrelin: a prospective randomised phase II trial. *British journal of cancer*, v. 114, n. 12, p. 1318–25, 14 Jun. 2016.

YAZDIAN-ROBATI, R. et al. Comparative proteome analysis of human esophageal cancer and adjacent normal tissues. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 20, n. 3, p. 265–271, Mar. 2017.

ZHANG, Q. et al. Reduced expression of tissue factor pathway inhibitor-2 contributes to apoptosis and angiogenesis in cervical cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, v. 31, n. 1, p. 1, 2 Jan. 2012.

ZHANG, Y. et al. Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, v. 30, n. 1, p. 98, 17 Oct. 2011.

ZHENG, W. et al. Regulation of cellular senescence and p16(INK4a) expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 30, p. 31524–32, 23 Jul. 2004.

ZIJLMANS, H. J. et al. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer. *British Journal of Cancer*, v. 100, n. 10, p. 1617–1626, 7 May 2009.