



Janesly Prates

Investigação da expressão gênica diferencial em resposta aos efeitos da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero

São José do Rio Preto
2014

Janesly Prates

Investigação da expressão gênica diferencial em resposta aos efeitos da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto
2014

Prates, Janesly.

Investigação da expressão gênica diferencial em resposta aos efeitos da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero / Janesly Prates. – São José do Rio Preto, 2014

117 f. : il., tabs.

Orientador: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Coorientador: Sonia Maria Oliani

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

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

CDU – 575.113

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

Janesly Prates

Investigação da expressão gênica diferencial em resposta aos efeitos da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero

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

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Edson Guilherme Vieira
UNESP – Ilha Solteira

Prof^a. Dr^a. Andréia Machado Leopoldino
USP – Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
24 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Joacyr e Alaide, pessoas que amo e meus melhores mestres; pelo apoio incondicional e por não terem medido esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Muito Obrigada!

*À Profa. Dra. Flávia C. Rodrigues Lisoni, exemplo de mestre e,
ao mesmo tempo, de pessoa por quem tenho e terei, admiração.
Meu agradecimento pela oportunidade e orientação,
permitindo meu crescimento
profissional e pessoal.*

À minha coorientadora, Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, por ter me aceito em seu laboratório, por sua integridade, sabedoria e interação com este trabalho que me trouxe mais experiência e amadurecimento com suas sugestões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo agradeço a DEUS, por ter me concedido vida, saúde e paz e, em todos os momentos estar guiando meus passos, me protegendo, me dando entendimento e conforto nas fases difíceis e criando soluções surpreendentes para eu poder sorrir nas conquistas. Agradeço por mais esta vitória!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2012/08177-4) pela bolsa de Mestrado concedida.

Ao Programa e professores da Pós-graduação em Genética 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, colaboração e competência.

À Profa. Dra. Eloiza H. Tajara, coordenadora do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica (LMMBM), da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, por possibilitar a realização de cultura celular e técnicas de Biologia Molecular em seu laboratório, e pelas imprescindíveis sugestões.

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

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, por me receber em seu

laboratório e pelos recursos, equipamentos e materiais oferecidos para realização da Técnica de Hibridização Subtrativa Rápida.

À Auxiliar de Pesquisa Científica e Tecnológica Anemari Ramos Dinarte dos Santos, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo ensino da Técnica de Hibridização Subtrativa Rápida, pela solicitude, paciência e por ter me acolhido amigavelmente.

À Profa. Dra. Cristiane Damas Gil, do Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP-EPM, São Paulo, pelo auxílio na técnica de imunocitoquímica ultraestrutural, pela sua competência, dedicação, amizade e acolhimento.

À querida amiga Gabriela Bueno Franco, pessoa dedicada e companheira, por quem tenho carinho e por compartilhar vários momentos importantes.

Aos valiosos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Cláudia Bosnic Mello Bochi, Lucas Ribeiro de Azevedo, Carla Patrícia Carlos, Ana Paula Girol, Kallyne Kioko Minura, Caroline de Freitas Zanon, Nathália Martins Sonehara, Jéssica Zani Lacerda, Laila Toniol Cardin, Marina de Paula Silva, Aline Camargo Miranda, Alexandre Dantas Gimenes, Marystela Fávero Oliveira, Rafaela Molás, Andréia Rodrigues de Moraes, Rubens de Paula Junior, Analice Andreoli da Silva, Cristina Ribeiro Mendes, uma equipe a qual é exemplo de trabalho com alegria e entusiasmo.

Ao meu irmão Jean Prates, pelo carinho mesmo estando longe.

Ao Juliano César do Amaral, meu namorado, pelo apoio e compartilhamento das dificuldades.

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

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”.

Clarice Lispector

RESUMO

O carcinoma de colo de útero, também denominado câncer cervical, é o segundo tipo de câncer mundialmente mais frequente em mulheres, sendo a quarta causa de morte em países em desenvolvimento. A carcinogênese de colo de útero está relacionada com alterações genéticas, infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV), angiogênese e processos inflamatórios. A idéia de que a inflamação está envolvida na tumorigênese é apoiada pela observação de que surge frequentemente em áreas de inflamação crônica. Por outro lado, a resposta inflamatória é controlada pela ação de mediadores anti-inflamatórios, que atuam para manter a homeostasia da resposta imunológica e prevenir a lesão tecidual. Entre esses mediadores destacamos a anexina-A1 (ANXA1), proteína de 37 kDa, que é expressa pelas células tumorais e atua como moduladora do processo inflamatório. Diante dessas considerações, investigamos, *in vitro*, a influência dessa proteína nas células SiHa sobre a morfologia, proliferação e expressão gênica e proteica. Para isso foi cultivada a linhagem celular SiHa em meio completo e tratada com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} para avaliar o efeito dessa proteína nos tempos de 2, 4, 24, 48 e 72 horas na morfologia e proliferação celular. Os resultados mostraram que o peptídeo não alterou a morfologia das células SiHa, no entanto diminuiu a proliferação celular, evidenciando o tempo de 72 horas como o mais significativo pelas análises estatísticas, seguido de um novo cultivo para posterior análise imunocitoquímica ultraestrutural, extração de RNA e desenvolvimento da técnica de Hibridização Subtrativa Rápida (RaSH). A validação dos seis genes diferencialmente expressos foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). A expressão da proteína ANXA1 foi observada diminuída nas células SiHa tratadas com o peptídeo pelas análises imunocitoquímicas ultraestruturais. A técnica de RaSH resultou em 82

genes diferencialmente expressos após o tratamento com ANXA1_{Ac2-26}. Seis desses genes (*HIF1A*, *ID1*, *LDHA*, *NCOA3*, *RAB13*, *TPT1*), devido a suas funções estarem relacionada com processos tumorigênicos, foram validados em RT-qPCR, confirmando a baixa expressão do gene *ID1*. Também foram interligadas, pelo *Ingenuity Systems*®, as vias de sinalização celular, das quais a ANXA1 participa, importantes para o desenvolvimento tumoral. Assim, nossos dados apontam a relevância de estudos futuros com as células SiHa para o desenvolvimento de novas terapias, focando as atividades gênicas que envolvem a ação da ANXA1 e as aplicações dessa proteína como uma possível terapêutica no carcinoma cervical uterino.

Palavras chaves: câncer cervical, anexina A1, expressão gênica diferencial, cultura de células, hibridização subtrativa rápida (RaSH), PCR quantitativo em tempo real.

ABSTRACT

Carcinoma of the cervix, also called cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide and is the fourth leading cause of death in developing countries. The cervical carcinogenesis is related to genetic alterations, infection with Human Papillomavirus (HPV), angiogenesis and inflammation. The idea that inflammation is involved in tumorigenesis is supported by the observation that often arises in areas of chronic inflammation. Furthermore, the inflammatory response is controlled by the action of anti-inflammatory mediators that act to maintain homeostasis of the immune response and prevent tissue damage. Among these mediators is included annexin A1 (ANXA1), a protein of 37 kDa, which is expressed by tumor cells and acts as a modulator of the inflammatory process. Given these considerations, we investigated in vitro the influence of this protein in SiHa cells on the morphology, proliferation and gene and protein expression. In order to realize this aim, the cell line SiHa was cultured in complete medium and treated with the peptide ANXA1_{Ac2-26} to evaluate the effect of this protein on times 2, 4, 24, 48 and 72 hours in morphology and cell proliferation. The results showed that the peptide did not alter the morphology of SiHa cells, but decreased cell proliferation, indicating the time 72 hours as the most significant by statistical analysis, followed by a further cultivation for subsequent ultrastructural immunocytochemical analysis, RNA extraction, and development of technical Rapid Subtractive Hybridization (RaSH). The validation of six differentially expressed genes was performed by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). The expression of ANXA1 was decrease in cells treated with the peptide observed by ultrastructural immunocytochemical analysis. The RaSH technique resulted in 82 differentially expressed genes after treatment with ANXA1_{Ac2-26}. Six of these genes (HIF1A, ID1, LDHA, NCOA3, RAB13, TPT1), because their

functions are related to tumorigenic processes were validated in RT - qPCR, confirming the low expression of gene ID1. Were also studied the cell signaling pathways, including that ANXA1 participates, by Ingenuity © Systems. Thus, our data suggest the importance of future studies with SiHa cells for the development of new therapies, focusing on gene activities that involve the action of ANXA1 and applications of this protein as a possible therapy in cervical carcinoma.

Keywords: *cervical cancer, annexin A1, differential gene expression, cell culture, rapid subtractive hybridization (RasSH), quantitative real-time PCR.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da proteína anexina, mostrando os aminoácidos da região N-terminal e as 4 repetições de 70-80 aminoácidos na região C terminal.....	26
Figura 2. Modelo de duas placas com 6 poços contendo apenas um tipo celular (SiHa), sem tratamento (controle) e tratada com ANXA1, coletados nos cinco diferentes tempos do experimento (2, 4, 24, 48 e 72 horas).....	34
Figura 3. Esquema representativo da técnica de RaSH.....	37
Figura 4. Análise da morfologia da linhagem celular SiHa (A) Controle e (B) tratada com o peptídeo ANXA1 _{Ac2-26} [10µg/ml].....	49
Figura 5. Curva de crescimento da linhagem SiHa nos cinco diferentes tempos e tratamento com o peptídeo ANXA1 _{Ac2-26} , na concentração de 10µg/mL.....	50
Figura 6. Detecção imunocitoquímica ultraestrutural da localização subcelular da proteína ANXA1 nas células SiHa tratadas ou não com o peptídeo ANXA1 _{Ac2-26}	51
Figura 7. Foto do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, mostrando a presença das duas bandas ribossomais 28S e 18S.....	52
Figura 8. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, mostrando o amplificado do cDNA, referente ao gene β -actina (banda de 613 pares de base).....	53
Figura 9. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, mostrando o amplificado da segunda fita de cDNA referente ao gene <i>GAPDH</i> (banda de 600 pares de base).....	54
Figura 10. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, para a verificação da digestão com a enzima <i>MboI</i>	55
Figura 11. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, referente a ligação dos adaptadores.....	56
Figura 12. Relação dos genes obtidos na subtração das células controle (SUB I).....	58
Figura 13. Relação dos genes obtidos na subtração das células tratadas com peptídeo ANXA1 _{Ac2-26} (SUB II).....	59
Figura 14. Expressão gênica por PCR em tempo real.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema do experimento realizado em dias, em duas placas de cultura de 6 poços para duas condições diferentes (controle,ANXA1).....	34
Tabela 2. Iniciadores para os genes de interesse.....	46
Tabela 3. Quantificação do RNA total em NanoDrop.....	52
Tabela 4. Quantificação do amplificado de DNA em NanoDrop.....	56
Tabela 5. Descrição dos genes analisados. Informações referentes a funções e processos de que participam.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL : microlitros

%: porcentagem

>: maior

\leq : menor ou igual

$^{\circ}\text{C}$: graus célsius

μg : microgramas

μM : micromolar

ACTB: β -actina

ANXA1: Anexina A1; Proteína Anexina A1

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

Br: Brasil

Ca_{2+} : íon calcio

cDNA: DNA complementar

cm^2 : centímetros quadrados

cm^3 : centímetros cúbicos

CO_2 : gás carbônico

COX: ciclo oxigenase -2

Ct: Cycle threshold

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DEPC: água ultrapura, tratada com Dietil Pirocarbonato

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GO: Gene Ontology

HIF1A: fator induzido por hipóxia 1- alfa

HPV: Papilomavirus Humano

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

IBILCE: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

IDI: inibidor de ligante de DNA-1, proteína dominante negativo helix-loop-helix

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

mg: miligrama

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

NCOA3: receptor nuclear coativador-3

NF- κ B: Fator de crescimento nuclear kappa B

NH₄OAc: acetato de amônio

ng: nanograma

NM: número da sequência do RNAm no site do Gene Ontology

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

RAB13: membro da família do oncogene RAS

RaSH: Hibridização Subtrativa Rápida

RefSeq: sequências de referência

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAi: RNA de interferência

rpm: rotação por minuto

RT: transcriptase reversa

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

SOC: meio de cultura

Sub I: tester= células SiHa controle (sem tratamento) *versus* driver=células SiHa tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}

Sub II: tester= células SiHa tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} *versus* driver= células SiHa controle (sem tratamento)

TFPI-2: inibidor da via do fator tecidual-2

TLRs: receptores toll-like

TPT1: proteína tumoral, transducionalmete controlado-1

TRIzol: solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina

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	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Cultivo da linhagem celular SiHa	32
3.2 Tratamentos Farmacológicos.....	32
3.3 Índice de proliferação celular e análise da morfologia celular	33
3.4 Fixação e processamento e, inclusão para microscopia eletrônica de transmissão	34
3.5 Imunocitoquímica ultraestrutural	35
3.6 Extração de RNA total.....	36
3.7 Quantificação e avaliação da integridade do RNA.....	38
3.8 Síntese da primeira fita do cDNA.....	38
3.9 Síntese da segunda fita do cDNA.....	39
3.10 Digestão do cDNA pela endonuclease de restrição <i>MboI</i>	40
3.11 Ligação dos adaptadores.....	41
3.12 Digestão com a endonuclease de restrição <i>XhoI</i>	42
3.13 Hibridização subtrativa e construção das bibliotecas gênicas.....	43
3.14 Ligação ao plasmídeo pZero.....	43
3.15 Transformação de bactérias eletrocompetentes.....	43
3.16 Seleção de clones para sequenciamento.....	44
3.17 Análises das sequências geradas.....	44
3.18 PCR quantitativa (RT-qPCR).....	45
4. RESULTADOS	48
4.1 Morfologia Celular	49
4.2 Índice de Proliferação Celular	49
4.3 Imunocitoquímica ultraestrutural	50
4.4 Extração de RNA total	52
4.5 Síntese de cDNA primeira fita.....	53
4.6 Síntese de cDNA segunda fita	53
4.7 Digestão do cDNA pela endonuclease de restrição <i>MboI</i>	54
4.8 Ligação dos adaptadores aos fragmentos gerados.....	55
4.9 Hibridização e construção das bibliotecas subtrativas.....	56
4.10 PCR quantitativa (RT-qPCR).....	61

5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS	73
ANEXO 1.....	84
ANEXO 2	96

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de colo de útero, também chamado de câncer cervical, é o segundo tipo de neoplasia mundialmente mais frequente em mulheres. 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 (JEMAL et al., 2011). Mulheres do sul e leste da África, América Central e América do Sul possuem grande risco de desenvolver câncer cervical, com uma incidência média anual de 40 casos por 100.000 mulheres (FRANCO et al., 2003). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontaram para o ano de 2012 aproximadamente 17 mil novos casos, fazendo cinco mil vítimas fatais por ano.

Aproximadamente 35% das mulheres diagnosticadas com carcinoma cervical tem a doença recorrente, com 90% desses achados nos três anos após o tratamento inicial (PECTASIDES et al., 2008). Assim, terapias alvo e estratégias de quimio e radioterapias são essenciais para a redução da mortalidade por esta malignidade.

Várias alterações genéticas e epigenéticas ocorrem durante a tumorigênese cervical. 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). Zhang e colaboradores (2012) verificaram que a diminuição da expressão do gene inibidor da via do fator tecidual -2 (TFPI-2) desempenha papel significativo na apoptose de células tumorais e na angiogênese em pacientes com câncer cervical, podendo ter uma função inibitória durante seu desenvolvimento. Pelas análises imunohistoquímicas, eles observaram a presença deste fator apenas no citoplasma das lesões cervicais e sua expressão diminuída, conforme o aumento da progressão tumoral, podendo ser considerado um gene supressor de tumor.

Alguns genes relacionados com este tipo de câncer incluem *CCNA1*, *CHFR*, *FHIT*, *PAX1*, *PTEN*, *SFRP4*, *TSLC1*, entre outros (ONGENAERT et al., 2008), e eles possuem diferentes funções como regulação da transcrição e expressão, uma das quais tem baixa regulação com hipermetilação do promotor levando à lesões precursoras no desenvolvimento cervical e na transformação maligna.

Outro fator relacionado diretamente ao carcinoma de colo de útero é a infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV), cerca de 90% dos casos estão associados com o HPV como agente causativo (JAAFAR et al, 2009; WALBOOMERS et al., 1999). Uma característica comum desse tipo de tumor é a expressão elevada de dois oncogenes,

chamados E6 e E7, que codificam proteínas multifuncionais conhecidas por sua habilidade de inativar os supressores tumorais, p53 e pRb, respectivamente (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). Essa expressão alterada dos oncogenes leva a instabilidades no genoma por bloqueio do ciclo celular e desregulação dos checkpoints nessas células devido a perda dos supressores tumorais p53 e pRb, progredindo então o processo tumorigênico (INCASSATI et al., 2006). 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).

Em linhagens de tumores cervicais, SiHa e HeLa, foi observado que o silenciamento do gene MLL5 β (uma isoforma do gene MLL5) e a baixa regulação das oncoproteínas E6 e E7 resultam na restauração dos níveis da proteína p53 e reduzem a fosforilação da pRb (YEW et al., 2011).

Dentre os diversos tipos de HPV, 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 propensos a evoluírem para carcinoma escamoso celular de cérvix do que os outros tipos (CLIFFORD et al., 2003).

O HPV16 é detectado mais frequentemente e é responsável por mais de 50% dos casos de câncer de colo de útero, tendo sua carcinogênese atribuída às interações das oncoproteínas E6 e E7 com as proteínas celulares do hospedeiro, envolvidas no ciclo celular resultando em transformação e imortalização das células (MÜNGER et al., 1989). Ambas as proteínas, E6 e E7, são capazes de modular diversos genes da célula hospedeira. O HPV 18 responde por 10% dos casos e os outros tipos de HPV contribuem para menos de 5% dos casos. Salienta-se que os fatores de risco para o câncer cervical estão relacionados a características tanto do hospedeiro quanto do vírus, como exposição ao HPV, oncogenicidade viral, ineficiência da resposta imune e presença de cocarcinógenos (ROBBINS e COTRAN, 2010).

Em um estudo com linhagem celular de hepatoma, Lara-Pezzi (2002) e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, o papel das proteínas virais sobre a invasividade tumoral, observando a capacidade da proteína X do vírus da hepatite B

(HBV) em induzir a expressão de metaloproteinases de matriz MMP-2 e MT1-MMP (MMP-14), via mecanismo dependente da Cox-2. Nesse mesmo raciocínio, uma pesquisa com linhagens celulares de câncer de colo de útero para HPV positivo (SiHa com HPV16, Caskie com HPV16 e HeLa com HPV18) demonstrou que as oncoproteínas E6 e E7 cooperam na invasividade do tumor por especificamente regular a transcrição de metaloproteinases e contribuem para um mau prognóstico do câncer cervical (KAEWPRAG et al., 2013).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que infecções pelo HPV podem interferir na sinalização de receptores toll-like (TLRs) durante a transformação maligna do colo do útero (DE CARLO, et al, 2012). Nesse contexto, Roszak e colaboradores (2012) sugerem que polimorfismos nesse receptor pode ser um fator de risco de câncer cervical.

Apesar da infecção do HPV ser o principal fator de risco relacionado a esta doença, há outros fatores que contribuem com o desenvolvimento do carcinoma de colo de útero, entre eles a idade; número de parceiros sexuais, o qual tem sido relacionado com co-infecções; fumo; uso prolongado de contraceptivos hormonais; e um elevado número de gravidez, o qual tem sido associado ao fato de que um grande número de nascimentos aumenta as lesões no canal cervical ou causa imunossupressão nesta área (SOTO-DE LEON et al., 2011). O hormônio estrógeno também é um dos fatores relacionados com este tipo de câncer, podendo promover ou suprimir o desenvolvimento neoplásico. O colo uterino é altamente sensível ao estrógeno e, durante o ciclo menstrual, as células epiteliais cervicais proliferam e se diferenciam à medida que os níveis desse hormônio aumentam, resultando em epitélio hiperplásico sem mudanças patológicas. Esse hormônio não apenas contribui para a gênese como também para a manutenção da doença cervical neoplásica (CHUNG et al., 2010).

A carcinogênese de colo de útero também está relacionada com angiogênese e processos inflamatórios. A abundância de células inflamatórias, que é uma característica do microambiente tumoral, vem sendo foco de muita discussão (ZIJMANS et al., 2009). A idéia de que a inflamação está envolvida na tumorigênese é apoiada pela observação de que o câncer surge freqüentemente em áreas de inflamação crônica. Os exemplos incluem a associação da pancreatite crônica e da colite ulcerativa com câncer de pâncreas e de cólon, respectivamente (CLEVERS, 2004; FARROW et al., 2004). Outro exemplo é o desenvolvimento dependente de inflamação de tumores induzidos

por injúria em galinhas infectadas pelo vírus do sarcoma de Rous (MARTINS-GREEN et al., 1994).

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

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

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 et al., 1996; TLSTY; HEIN, 2001). Além disso, como o VEGF, a angiopoetina e as metaloproteinases estão entre os fatores produzidos pelas células inflamatórias presentes no tumor, também ocorre estímulo para mitose de células endoteliais vasculares e remodelamento da matriz extracelular que contribuem para a angiogênese (CARMELIET; JAIN, 2000).

Fica evidente a partir destes dados que um grande número de padrões de sinalização deve participar das interações célula inflamatória-célula tumoral. Um exemplo é o padrão de sinalização do NF- κ B, um fator de transcrição cuja ativação é dependente da quinase I- κ B (IKK) e ocorre em resposta às infecções virais e microbianas e a citocinas pró-inflamatórias. O NF- κ B, que está relacionado com a transcrição de genes cujos produtos inibem a apoptose, já foi detectado ativado ou com expressão elevada em muitas neoplasias (GRETEN et al., 2004). Recentemente, foi

reconhecido o seu papel em tumores precedidos por inflamação crônica, que mostraram tamanho significativamente reduzido após inativação específica de IKK/NF- κ B em células mielóides, provavelmente em consequência da expressão diminuída de citocinas pró-inflamatórias (GRETEN et al., 2004).

Por outro lado, a resposta inflamatória é controlada pela ação de mediadores anti-inflamatórios, que atuam para manter a homeostasia da resposta imunológica e prevenir a lesão tecidual. Entre esses mediadores destacamos a anexina-A1 (ANXA1), proteína de 37 kDa, que é expressa pelas células tumorais e atua como moduladora do processo inflamatório (FLOWER, 1988; SILISTINO-SOUZA et al., 2007; ALVES et al., 2008;).

A família das anexinas compreende mais de 160 proteínas, presentes em mais de 65 espécies diferentes, desde fungos a plantas e vertebrados. Uma proteína anexina segue dois critérios principais: ser capaz de se ligar a fosfolipídeos carregados negativamente de maneira dependente de cálcio (Ca^{2+}) e conter uma estrutura conservada de cerca de 70 aminoácidos repetidos. Esta ligação é reversível e a remoção de Ca^{2+} por agentes alquilantes conduz a uma liberação de anexinas a partir da matriz de fosfolipídeos (GERKE; MOSS, 2002).

Estruturalmente, as anexinas (Figura 1) compreendem dois domínios: uma pequena região N-terminal, variando em comprimento e composição, e um domínio central, região C-terminal, formado por quatro a oito dobras repetidas de uma sequência conservada de 70 a 80 aminoácidos (RESCHER; GERKE, 2004). O domínio N-terminal é específico para cada membro dessa família e interage com os diferentes ligantes dessas proteínas, enquanto a região C-terminal é responsável pela afinidade ao cálcio e consequente ligação aos fosfolipídios.

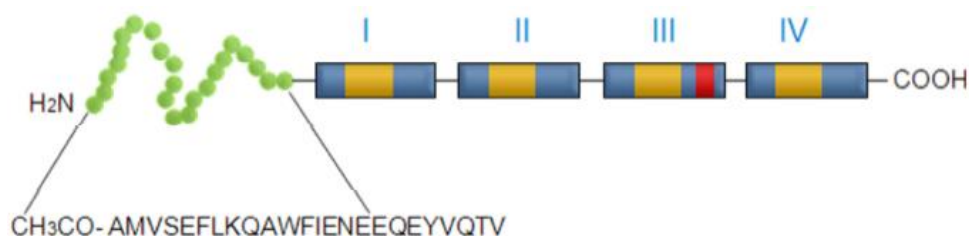


Figura 1. Esquema da proteína anexina, mostrando os aminoácidos da região N terminal e as 4 repetições de 70-80 aminoácidos na região C terminal (RODRIGUES-LISONI; HENRIQUE; TAJARA, 2011).

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

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

A expressão e localização da ANXA1 têm sido investigadas em modelos experimentais de inflamação aguda induzida por carragenina no mesentério de ratos, por meio da análise dos leucócitos extravasados e endotélio vascular (OLIANI et al., 2001; GIL et al., 2006), e de inflamação crônica granulomatosa na pele de camundongos (GIBBS et al., 2002; OLIANI et al., 2008). Ainda, após a descoberta por Cirino et al. (1993) de que a atividade biológica da ANXA1 poderia ser reproduzida pelos primeiros vinte e seis aminoácidos da porção N-terminal da proteína (peptídeo ANXA1_{Ac2-26}), ou por alguns peptídeos menores (PERRETTI et al., 2001), tornou-se uma prática comum o uso dessas moléculas em modelos experimentais de inflamação aguda (DAMAZO et al., 2006; GAVINS et al., 2007), crônica (GIBBS et al., 2002) e sistêmica (DAMAZO et al., 2005). A administração desses peptídeos miméticos da ANXA1 leva a ativação dos seus receptores, que são mais abundantes em leucócitos aderentes, e promove a ativação celular e a sinalização intracelular, com o destacamento dos leucócitos do endotélio (GAVINS et al., 2003; GASTARDELO et al., 2009).

A superexpressão do RNAm e da proteína ANXA1 também foram detectados em carcinoma de células escamosas de pênis, relacionados com a infecção pelo HPV de alto risco, isto explica a importância do papel da ANXA1 na regulação da invasão e migração celular. A expressão da proteína ANXA1 mostrou-se significativamente aumentada nestas análises, independentemente do subtipo de carcinoma quando comparado com amostras HPV negativo (CALMON et al., 2013).

A expressão da ANXA1 na carcinogênese cervical tem sido pouco investigada. Lee e colaboradores (2008) detectaram diminuição nos níveis dessa proteína e do seu RNAm a medida que o carcinoma evoluía, concluindo que a ANXA1 pode ser considerada um marcador biológico na progressão tumoral. Além disso, o estudo de Shen e colaboradores (2010) detectou a baixa expressão da ANXA1 em células SiHa, linhagem celular derivada de tumor de cérvix, tratadas com complexo citrato lantanun sugerindo um papel dessa proteína na via de apoptose, regulando os fatores de crescimento relacionados.

Em outro estudo também utilizando a linhagem celular SiHa, foi isolada e caracterizada uma subpopulação altamente tumorigênica desta linhagem, a qual exibiu características de células iniciadoras de câncer (CICs), e estas características apresentaram resistência a radiação em tumores sólidos (LOPEZ et al., 2012). Assim, pensando em novas estratégias de tratamento, a administração da ANXA1 nas células carcinogênicas poderia ser uma alternativa.

Desse modo, os trabalhos relacionados com a ANXA1 têm contribuído para um maior entendimento do papel desta proteína no processo inflamatório e tumorigênico. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a ANXA1 modula as respostas celulares nos processos inflamatórios ainda não estão completamente determinados. Os dados disponíveis sugerem que essa proteína pode ter, além de seu importante papel no processo inflamatório, um envolvimento significativo no câncer, por meio de cascatas de sinalização que incluem genes relacionados com o ciclo celular, com a diferenciação e com a apoptose.

2. OBJETIVOS

Em função da importância do possível efeito anti-inflamatório da administração da ANXA1 nas células carcinogênicas, foi proposto o presente trabalho que tem como objetivo geral avaliar a influência dessa proteína nas células SiHa sobre a morfologia, proliferação celular e expressão gênica e proteica, observando como a anexina modula a expressão gênica e como essas alterações podem participar do processo tumorigênico.

Os objetivos específicos compreendem a investigação do efeito da administração da ANXA1 *in vitro* nas células SiHa controles e tratadas nos seguintes aspectos:

1. Na morfologia, pela microscopia óptica ;
2. No índice de proliferação celular, pelo ensaio de curva de crescimento;
3. Na expressão gênica, pela técnica de hibridização subtrativa rápida (RaSH) para examinar os efeitos da adição do peptídeo da região N-terminal da ANXA1 (ANXA1_{Ac2-26});
4. Validar, por técnicas de PCR quantitativa, a expressão de genes diferencialmente expressos encontrados nessas células como possíveis marcadores moleculares potencialmente relacionados com tratamentos anti-inflamatórios;
5. Na expressão proteica, pela técnica de Imunocitoquímica ultraestrutural;
6. Investigar vias de sinalização celular, das quais a ANXA1 participe, importantes para o processo inflamatório e carcinogênico, pelo software *Ingenuity Systems*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo da linhagem celular SiHa

As células SiHa (derivadas de células de carcinoma epidermóide de cérvix), fornecidas gentilmente pela Prof^a Dr^a Eloiza Helena Tajara da Silva, constitui uma linhagem celular que reúne as melhores condições técnicas para o desenvolvimento desse projeto. Essas células foram cultivadas em meio completo MEM-Earle (Cultilab, Br), pH7,5 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Br), 1% de aminoácidos não essenciais 10mM (*Invitrogen, Carlsbad, USA, UK*) e 1% de antibiótico/antimicótico (*Invitrogen, Carlsbad, USA, UK*) e semeadas em garrafas de cultura de 75 cm², na concentração de 10⁶ células e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, até se fixarem na garrafa de cultura. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou até as células se tornarem confluentes. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* e, quando a densidade celular atingiu confluência de 80-90%, o material foi submetido à desagregação celular por meio de tripsina e subdividido em duas réplicas. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, em colaboração com a Profa. Dra. Sonia Maria Oliani e no Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP) em colaboração com a Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva.

3.2 Tratamentos Farmacológicos

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

- controle: apenas meio completo;
- ANXA1: tratada com o peptídeo N-terminal Ac2-26 da ANXA1 (Ac-MVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK) (RAYNAL; POLLARD, 1994), nas concentrações de 5µg/mL (RODRIGUES-LISONI et al., 2006) e de 10µg/mL, em cinco diferentes tempos (2, 4, 24, 48 e 72 horas).

3.3 Índice de proliferação celular e análise da morfologia celular

Para análise do índice de proliferação celular nas células SiHa, foi realizada uma curva de crescimento, com contagem de células cultivadas em placas de cultura de 6 poços, semeadas na concentração de 5×10^4 em 2mL de meio MEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem na placa de cultura. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro (MEM 0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas foi trocado o meio de cultura pelo meio completo e adicionado o peptídeo da ANXA1 em um conjunto de poços.

As células receberam a concentração final de 5µg/mL (em um primeiro experimento, seguindo dados da literatura) e 10µg/mL desse peptídeo para cinco diferentes tempos de contagem celular (2, 4, 24, 48 e 72 horas), as outras células das outras placas que não receberam o peptídeo continuaram nos seus respectivos poços para contagens futuras, apenas para uma comparação entre os diferentes tratamentos (controle e tratadas com o peptídeo) nos diferentes tempos.

Todas as células, nas duas placas de cultura, foram descoladas por ação da tripsina e contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro) em momentos diferentes (nos tempos de 2, 4, 24, 48 e 72 horas após o tratamento com o peptídeo), como esquematizado na Tabela 1 e representado na Figura 2. Esse experimento foi realizado em triplicatas.

O teste estatístico utilizado para o cálculo do índice de proliferação celular foi primeiramente o Teste de ANOVA (análise de variância), seguido do Teste de Tukey. O teste “Análise de Variância a um critério” foi utilizando, com o programa *GraphPad Prism 5 Instat (GraphPad Software)*, para comparar os grupos em cada tempo experimental. A diferença significativa foi assumida quando o valor de $P \leq 0,05$.

A morfologia celular foi avaliada no microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41*, do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP) em colaboração com a Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva.

Após estas análises, foram escolhidos o tempo e a concentração do peptídeo que deram uma maior diferença estatística significativa de crescimento celular, então as células foram processadas para as análises da expressão gênica diferencial, pela

tecnologia de hibridização subtrativa rápida (RaSH) e para a validação dos genes encontrados por PCR quantitativo.

Tabela 1. Esquema do experimento realizado em dias, em duas placas de cultura de 6 poços para duas condições diferentes (controle, ANXA1).

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

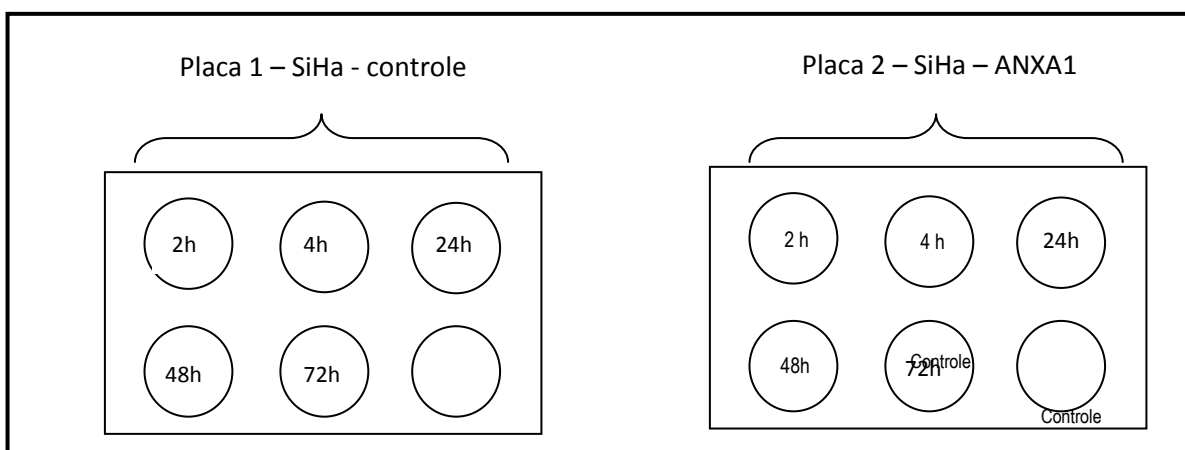


Figura 2. Modelo de duas placas com 6 poços contendo apenas um tipo celular (SiHa), sem tratamento (controle) e tratada com ANXA1, coletados nos cinco diferentes tempos do experimento (2, 4, 24, 48 e 72 horas).

3.4 Fixação, processamento e inclusão para microscopia eletrônica de transmissão

Amostras das células SiHa controle e tratadas foram cultivadas na concentração de 1 x 10⁶ células por garrafa de cultura e após o tratamento nos devidos tempos, foram fixadas em glutaraldeído a 0,5% e paraformaldeído a 4%, tampão cacodilato de sódio

0,1 M, pH 7,4 por 24 horas, a 4°C. Em seguida, foram lavados no mesmo tampão, desidratados em uma série crescente de metanol (Merck-Germany) a -20°C e pré-incluídos em uma mistura de metanol a 100% e resina LRGold (London Resin Co., Reading, Berkshire, UK), em partes iguais, durante 24 horas, a -20°C. Após, foram incluídos em resina LRGold pura por 24 horas, a -20°C e expostos à luz ultravioleta (OLIANI et al., 2001).

Para análise de microscopia eletrônica de transmissão, cortes de aproximadamente 50 nm foram obtidos no ultramicrotomo (Reichert Ultracut; Leica, Áustria) e coletados em telas de níquel para posteriores análises imunocitoquímicas.

3.5 Imunocitoquímica ultraestrutural

A reação (marcação) foi usada para detectar a localização e a expressão da proteína ANXA1 nas células SiHa. Cortes ultrafinos (~50nm) das amostras foram preparados e incubados de acordo com os seguintes procedimentos: (a) água destilada por 5 minutos; (b) duas lavagens (5 minutos cada) em tampão fosfato a 0,1 M (PBS), contendo ovoalbumina a 1% (PBEA); (c) bloqueio em PBEA a 5% por 30 minutos; (d) monitoramento da reatividade da ANXA1 pelo anticorpo policlonal sheep anti-AnxA1, denominado LCPS1 (sheep polyclonal antibody raised against the N-terminal peptide of human AnxA1), na diluição 1:200 em PBEA a 1%, por 2 horas; (e) após três lavagens (5 minutos cada) com PBEA a 1% e Tween 20 a 0,01%, o anticorpo secundário donkey anti-sheep IgG (Fc fragmento específico), conjugado com partículas de ouro coloidal de 15 nm (British BioCell International, Cardiff, UK), foi adicionado (1:100 em PBEA a 1%) e mantido por 1 hora; (f) finalmente, após 1 hora de incubação com o anticorpo secundário, os cortes foram lavados em PBEA a 1% e Tween 20 a 0,01% (duas lavagens de 5 minutos) e em água destilada. No controle da reação foram utilizados somente PBEA 1%. Após as reações, os cortes ultrafinos foram contrastados por 15 minutos em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM900, do Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP-EPM, São Paulo, SP, sob-responsabilidade da Profa. Dra. Cristiane Damas Gil.

A expressão da proteína ANXA1 foi quantificada nas células SiHa, com e sem tratamento, utilizando-se 24 eletromicrografias para cada condição experimental. A área

de cada compartimento celular foi determinada pelo software analisador de imagens Axiovision (ZEISS). No núcleo e no citoplasma, a densidade das partículas de ouro coloidal foi calculada como média \pm S.E.M. (desvio padrão das médias) do número de partículas por μm^2 .

As diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância seguida, quando significativa, pelo teste de Bonferroni e t de student. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

3.6 Extração de RNA total

Após a investigação, pelo teste de proliferação celular, foi extraído o RNA das células SiHa submetidas às condições experimentais (controle e tratado), pelo método do TRIzol.

As células SiHa foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/ml em garrafas de cultura com 75 cm^2 , durante três dias (72 horas), com o tratamento de $10 \mu\text{g/mL}$ do peptídeo. O meio das garrafas de cultura foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS e adicionados 3 mL de TRIzol, uma solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. O material de cada amostra foi distribuído em três tubos de 1,5 mL e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de clorofórmio gelado para cada 1 mL de amostra em TRIzol, os tubos foram homogeneizados por 1 minuto e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 20 minutos a 4°C , para separar a fase aquosa, que contém RNA, da interfase branca e leitosa que contém principalmente proteínas, e da fase orgânica, com DNA e proteínas. A fase aquosa com RNA foi transferida para um novo tubo com $400 \mu\text{L}$ de isopropanol gelado e $10 \mu\text{g}$ de glicogênio e mantida por 30 minutos à temperatura de -20°C . Após essa etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de etanol 70% gelado, agitado até se soltar do tubo e centrifugado a 7.500 rpm por 7 min a 4°C . O excesso de etanol foi retirado e o material ressuspensionado em $20 \mu\text{L}$ de água livre de nucleases (DEPC). As amostras foram colocadas em banho seco a 57°C , por 10 minutos, para a evaporação do etanol. O RNA foi posteriormente armazenado a -80°C (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), para o procedimento da técnica de Hibridização

Subtrativa Rápida (RaSH) (JIANG et al, 2000). Um esquema ilustrativo da técnica de RaSH está representado na Figura 3.

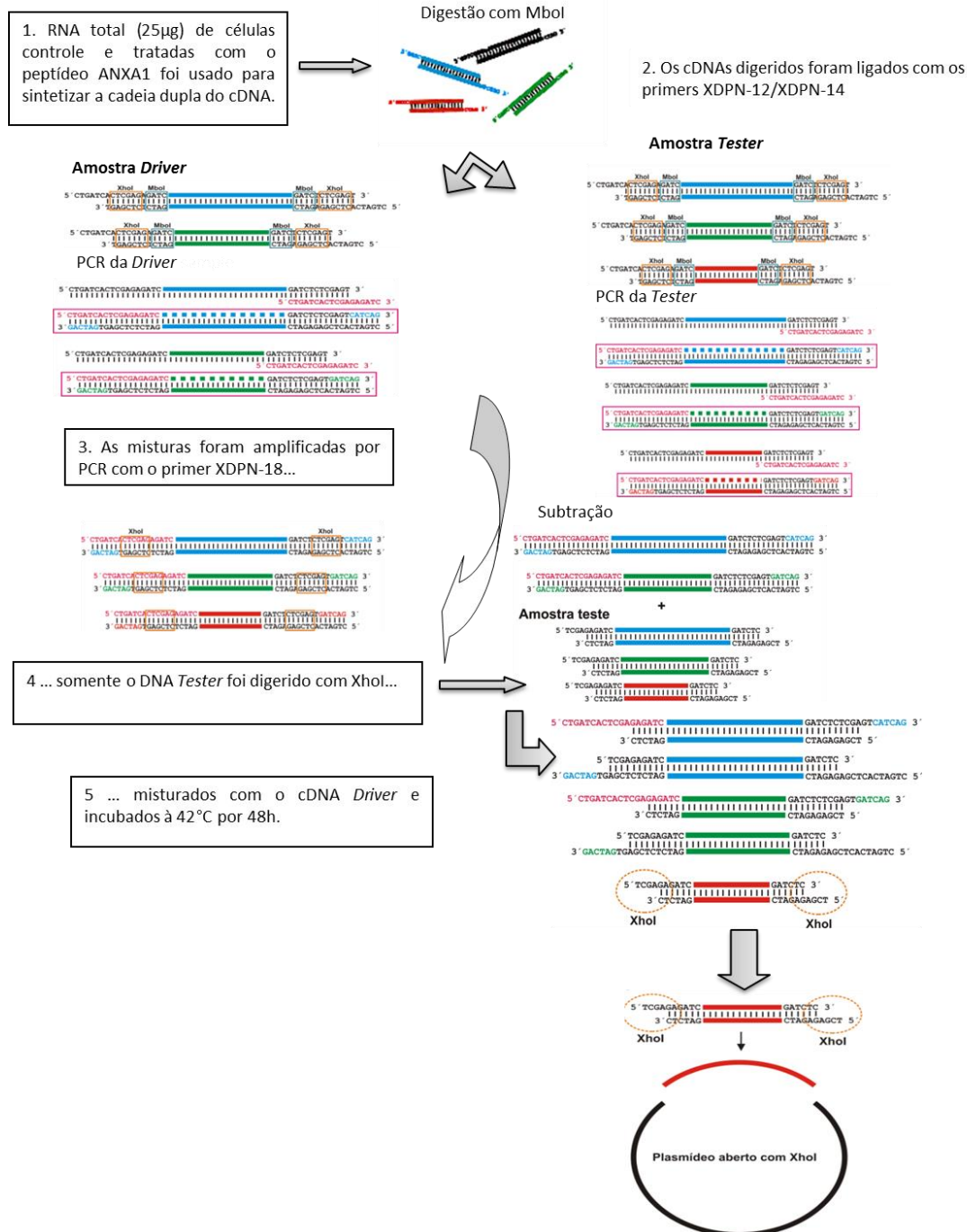


Figura 3: Esquema representativo da técnica de RaSH: O cDNA dupla- fita é obtido a partir de mRNA de cada amostra. Adaptadores com sítio para enzima de restrição são ligados as duas amostras. Somente a amostra utilizada como *tester* sofre digestão com enzima de restrição correspondente. A amostra *tester* é hibridizada com excesso da amostra *driver*. Assim, transcritos presentes nas duas amostras formam híbridos. Somente transcritos presentes na amostra *tester* apresentarão os sítios complementares nas duas extremidades e poderão ser clonados e posteriormente sequenciados.

3.7 Quantificação e avaliação da integridade do RNA

A concentração do RNA total obtido foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro NanoDrop *ND-1000* (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*), a 260/280 nm, para avaliar a pureza do RNA em relação à contaminação com proteínas, pela razão das absorbâncias. A absorbância máxima dos ácidos nucleicos sob luz UV ocorre no comprimento de onda de 260nm e 280nm nas proteínas. A razão dos valores de absorbância a 260 e a 280 deve ser entre 1,8 e 2,0 para identificar a pureza do RNA. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% pela observação das bandas ribossomais 18S e 28S.

3.8 Síntese da primeira fita do cDNA

A partir de 20µg de RNA, obtido da linhagem celular SiHa submetida às condições experimentais (controle e tratado com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}), sintetizou-se a primeira fita de DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa, utilizando o *Kit SuperScript™ II First-Strand cDNA Synthesis for Reverse Transcriptase* (RT-PCR) (Invitrogen) com 1 µL de oligo (dT) (500 µg/mL), a 65°C por 5 minutos. A mistura foi resfriada em gelo para a adição de 4,0 µL de 5X *First-Strand Buffer* [250mM Tris-HCl (pH 8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂], 2,0 µL de DTT (0,1 mM) e 1,0 µL de RNaseOUT™(40U/ µL). O material foi incubado a 42°C por 2 minutos e então foi adicionado 1,0 µL da enzima transcriptase reversa (RT) *SuperScript™ II* (200 U/µL). A mistura foi incubada novamente a 42°C por 50 minutos e, em seguida, a 70°C por 15 minutos para inativar a reação. O cDNA foi armazenado a -20°C para a utilização na tecnologia de RaSH.

A síntese da primeira fita de cDNA também foi realizada com o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem™), nesse caso, foi utilizado para a validação dos genes diferencialmente expressos, encontrados na tecnologia de RaSH, em PCR em tempo real. Utilizou-se cinco microgramas de cada amostra de RNA total, 10 µL de 10× *RT Buffer*, 10 µL de 10× *RT Random Primers*, 4,0 µL de 25× *dNTP Mix* (100 mM), 5,0 µL da enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL) e água *DEPC* para completar a reação para um volume final de 50 µL. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, depois a 37°C por 2 horas e por fim, a 85°C durante 5 minutos.

Após sintetizar a primeira fita de cDNA, foi realizada, em ambos protocolos, uma PCR com o gene constitutivo *β-actina* (*ACTB*) para a sua validação. Sendo assim, foram utilizados os seguintes reagentes: 2,0 µL de 10X PCR *Buffer* [200mM Tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl], 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,4 µL de dNTP Mix (10 mM), 1,25 µL de *Forward primer* (10µM), 1,25 µL de *Reverse primer* (10µM), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,0 µL do cDNA e 12,2 µL de água *DEPC* para completar a reação para um volume final de 20 µL. Para cada reação, foi realizado um controle negativo, o qual continha todos os reagentes, menos o cDNA.

A ciclagem utilizada era constituída de uma fase inicial a 94°C por 4 minutos, depois 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e ao final, uma fase de extensão a 72°C durante 7 minutos.

A visualização da banda que representa a primeira fita de cDNA foi realizada em gel de agarose 1,5% em uma corrida eletroforética de 100V/80mA por aproximadamente 40 minutos.

3.9 Síntese da segunda fita do cDNA

Ao volume total obtido na reação para obtenção da primeira fita foram adicionados 150 µL (qsp) de água *DEPC*, 30 µL de 5X *Second Strand Buffer*, 3 µL de dNTP mix (10mM), 1 µL DNA ligase (10U/ µL), 4 µL de DNA Polimerase I (10U/ µL) e 1 µL de RNase H (2U/ µL). Esta reação foi incubada por 2 horas a 16°C no Termo Mixer. Em seguida foram adicionados 2 µL de T4 DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen) e incubou-se por 5 minutos a 16°C. Ao cDNA obtido foi acrescentado 10 µL de EDTA (0,5M) para a inibição da ação enzimática, seguidos da extração do cDNA com 150 µL de fenol-clorofórmio na concentração 1:1(75 µL de fenol e 75 µL de clorofórmio). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente por 5 minutos, a 13.200rpm. Do sobrenadante, aproximadamente 140 µL foram transferidos para um novo tubo contendo 70 µL de NH₄OAc (7,5 M) (Acetato de Amônio) e 500 µL de etanol absoluto (100%), essa mistura foi incubada em freezer - 80°C por 30 minutos e posteriormente centrifugadas a 4°C por 30 minutos numa rotação de 13.200rpm. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se ao DNA precipitado 500 µL de etanol 70% gelado, seguida de uma nova centrifugação a 4°C por 10 minutos, repetindo-se essa lavagem por mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e o cDNA

permaneceu no Termo Mixer por 10 minutos a 37°C para a secagem. Ao final, o “pellet” formado foi diluído em 45 µL de água *DEPC*.

Uma alíquota de 1,5 µL do cDNA foi separada para validação da síntese da segunda fita, por meio da PCR com o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), sendo utilizado nessa reação, 0,25 µL desse cDNA, além de 2,5 µL de 10X BV Buffer, 1,5 µL de DMSO, 2,5 µL de dNTP Mix (10 mM), 1,0 µL de *Forward primer GAPDH*, 1,0 µL de *Reverse primer GAPDH*, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 16,0 µL de água *DEPC* para completar a reação para um volume final de 25 µL. A ciclagem utilizada foi constituída de uma fase inicial a 95°C por 2 minutos, depois 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e ao final, uma fase de extensão a 72°C durante 5 minutos. Para cada reação foi realizado um controle negativo, o qual continha todos os reagentes, menos o cDNA. A visualização da banda que representa a segunda fita de cDNA também foi realizada em gel de agarose 1,5% em uma corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 minutos.

Outra alíquota de 3,0 µL do cDNA dupla fita também foi separada para checagem da digestão após o tratamento com endonuclease de restrição *MboI*.

3.10 Digestão do cDNA pela endonuclease de restrição *MboI*

Aos tubos contendo as amostras de cDNA dupla fita foi adicionado 1,5 µL de água *DEPC* para um volume final de 42 µL, e dessa maneira, foram submetidas a reação de digestão, utilizando-se 2,0 µL da endonuclease de restrição *MboI* 10U/ µL (Promega), 5,0 µL de *Restriction Enzyme 10X Buffer*, 0,5 µL de *Acetylated BSA* (10µg/µl), mantidas por 1 hora a 37°C, seguida da adição de mais 1,0 µL da enzima *MboI* 10U/ µL (Promega) e incubação a 37°C “overnight”, aproximadamente 16 horas. Após essa etapa, retirou-se 3,0 µL de cada amostra para a confirmação da digestão, comparando-as com os 3,0 µL das amostras de cDNA dupla fita antes da digestão. Em cada poço foi colocado 5 µL de Azul de Bromofenol e 3 µL de amostra. A visualização foi realizada em gel de agarose 1,5%, em uma corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 minutos.

Em seguida, realizou-se a purificação do cDNA, completando a amostra para 60 µL com o reagente LOTE (tampão de diluição Tris-EDTA) e adicionando 100 µL de fenol clorofórmio (1:1), seguido de centrifugação em temperatura ambiente a 13000

rpm por 5 minutos e precipitação do sobrenadante por etanol absoluto (650 µL), acetato de amônia - NH₄Oac 7,5 M (50 µL) e *Mussel glycogen* (2,0 µL) em -80°C durante 3 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos (13000 rpm). O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se ao DNA precipitado 500 µL etanol 70% gelado, seguindo de centrifugação a 4°C por 10 minutos (13000 rpm), repetindo-se essa lavagem por mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” permaneceu em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos e diluído em 20 µL de água DEPC.

3.11 Ligação dos adaptadores

As sequências adaptadoras XDPN-14 (5' CTGATCACTCGAGA 3') e XDPN-12 (5' GATCTCTCGAGT 3') (JIANG *et al.*,2000), contendo um sítio de restrição para a enzima *XhoI*, foram adicionadas à 20 µL das referidas amostras digeridas, conforme se segue: 4,5 µL de XDPN-12, 4,1 µL de XDPN-14, 8 µL de 5X T4 DNA Ligase Buffer, 9U da enzima T4DNA Ligase (Invitrogen). As reações foram incubadas por 1 minuto a 55°C (desnaturação) seguida do resfriamento da temperatura até atingir 14°C (55°C 1 minuto, 52°C 2 minutos, 50°C 2 minutos, 28°C 4 minutos, 26°C 4 minutos, 14°C uma hora). Após o resfriamento, foi acrescentado aos tubos 9U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), para a ligação das sequências adaptadoras às extremidades dos cDNAs digeridos, e incubados a 14°C *overnight* em termociclador. Terminada a incubação foram adicionados às amostras 60 µL de LOTE, perfazendo um volume final de 100 µL.

Para verificar a ligação dos adaptadores e aumentar a quantidade de amostra, foi realizada uma reação de PCR com o oligonucleotídeo XDPN-18 (5' CTGATCACTCGAGAGATC 3') (JIANG *et al.*,2000) o qual é complementar as sequências dos adaptadores XDPN-14 e XDPN-12. A reação foi realizada com 2 µL da amostra (ligação), 2 µL do *primer* XDPN-18, 5 µL 10X Buffer, 4 µL dNTP, 0,5 µL Taq polimerase (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂, 35 µL de água DEPC. As reações foram submetidas a um ciclo de 72°C 5 minutos, seguidos por 25 ciclos de 94°C 1 minuto, 55°C 1 minuto, 72°C um minuto e 1 ciclo de 72°C 3 minutos. A visualização foi realizada em gel de agarose 1,5%, em uma corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 minutos.

A obtenção de maior massa do produto foi realizada com outras 20 reações de PCR, igualmente nas condições descritas acima. Após a amplificação, juntaram-se as 20

reações num mesmo tubo (aproximadamente 1 mL) separando 10 µL para verificação em gel de agarose 1,5%, em uma corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, cada amostra (controle e tratada com ANXA1_{Ac2-26}) foi dividida em 2 tubos com um volume de aproximadamente 500 µL, e submetidas aos procedimentos de purificação, precipitação, com solução fenol: clorofórmio (1:1). Em 4 novos tubos contendo 175 µL de acetato de amônio (NH₄OAc), 1000 µL de etanol absoluto, e 3 µL de *mussel glicogen* foram adicionados 250 µL da amostra. Essas amostras foram mantidas no freezer -80°C por uma hora e meia, para a precipitação. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C, a 13.200rpm. Desprezou-se o sobrenadante e às amostras foram adicionados 500 µL de etanol 70%, seguida por nova centrifugação, repetindo esta lavagem mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e as amostras permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Ao final, o “pellet” formado foi diluído em 25 µL de LOTE e o conteúdo de cada tubo foi unido, resultando em um volume final de 100 µL para cada amostra.

Após esse procedimento, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ® ND-1000 (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*) pela determinação da absorbância a 260/280 nm.

3.12 Digestão com a endonuclease de restrição *XhoI*

A amostra diferenciada (10 µg), chamada de *Tester*, foi submetida à digestão enzimática com a endonuclease de restrição *XhoI* (Invitrogen) conforme o procedimento a seguir: 5 µL de tampão, 4 µL da enzima *XhoI*, água *DEPC* qsp para um volume final de 50 µL, incubou-se a 37°C por 6 horas. Após a digestão, foi acrescentado 50 µL de LOTE ao tubo (*Tester*) e purificado com fenol clorofórmio (1:1) seguida por uma centrifugação por 5 minutos, a temperatura ambiente. Para a precipitação, foram adicionados às amostras 650 µL de etanol absoluto, 50 µL de acetato de amônio NH₄Oac 7,5 M e 4 µL de *Mussel glicogen*, as quais foram mantidas no freezer -80°C *overnight*. Após este período, centrifugou-se novamente as amostras a 4°C, 13.200rpm por 30 minutos e lavou-se os *pellets* 3vezes com 500 µL de etanol 70% , centrifugando-os. Os *pellets* secaram a temperatura ambiente por 15 minutos e então foram suspensos em 30 µL de LOTE.

3.13 Hibridização subtrativa e construção das bibliotecas gênicas

A hibridização subtrativa rápida (RaSH) foi realizada com duas subtrações, uma denominada de Biblioteca Subtrativa I (Sub I), na qual as células da linhagem SiHa controle (sem manipulação) participaram como *tester* e as células da linhagem SiHa tratadas com o peptídeo como *driver*, e a outra denominada de Biblioteca Subtrativa II (Sub II), onde ocorreu o contrário da primeira, ou seja, as células da linhagem SiHa controle (sem manipulação) participaram como *driver* e as células da linhagem SiHa tratadas com o peptídeo como *tester*.

Para a construção da biblioteca gênica “Sub I”, 100ng do cDNA *Tester* (amostra controle) foram misturados com 5µg de cDNA *Driver* (amostra tratada com o peptídeo) e 16,6 µL de tampão de ligação e para a preparação da “Sub II”, 100 ng do cDNA *tester* (amostra tratada como o peptídeo), 5 µg de cDNA *driver* (amostra controle) e 16,6 µL de tampão de ligação, foram misturados. As duas reações foram incubadas em um ciclo de 99,9°C 5 minutos, 42°C 1 hora e 42°C por 48 horas.

Após esse tempo, foram adicionados 80 µL de LOTE em cada mistura de hibridização, purificadas pela solução de fenol clorofórmio (1:1) e centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, purificado pelo método de fenol clorofórmio (1:1) e precipitado por etanol 70%. Por fim, ressuspendido em 20 µL de LOTE.

3.14 Ligação ao plasmídeo pZero

Da amostra ressuspendida, do item anterior, separou-se 3 µL e colocou num tubo com 0,5 µL do plasmídeo *pZero* (digerido com *XhoI*), 0,5 µL de 10X de *ligase Buffer* e 1 µL de *T4 DNA ligase* (4U) (Invitrogen). Incubou-se a 16°C por 3 horas. Após este tempo, foi acrescentado 100 µL de LOTE seguida de um nova purificação com fenol clorofórmio e precipitação com etanol 70%. Ao final ressuspendeu-se o *pellet* em 6 µL de LOTE.

3.15 Transformação de bactérias eletrocompetentes

A reação de ligação foi utilizada para transformação de células competentes TOP 10 (*Escherichia coli*). Para isso, 1 µL da reação de ligação foi adicionado num tubo contendo 50 µL de bactérias competentes. Essa reação foi transferida para uma cubeta (*FischerBiotech - Eletroporation Cubetes, 2mm Gap, sterile & disposable* -

CAT. NO.FBI02) apropriada para o aparelho eletroporador. O material foi submetido à eletroporação a um pulso de 2,5 kV, capacitância de 25 μ FD e resistência de 200 OHMS. Imediatamente após o pulso, foram adicionados 500 μ L de SOC (meio LB), o conteúdo foi transferido para tubos novos e foi agitado a 200 rpm por uma hora a 37°C.

3.16 Seleção de clones para sequenciamento

Após 1 hora de incubação, adicionou-se mais 500 μ L de SOC. Desta mistura, foi retirado 300 μ L e plaqueado em ágar LB com Zeocin [100mg/mL]. As placas de petri (então denominadas subtração I [sub I] e subtração II [sub II]) foram mantidas em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas.

A seleção dos transformantes foi realizada após este período de incubação, onde as colônias brancas foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a PCR com os oligonucleotídeos M13 *forward* (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13 *reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'), em uma reação composta de 1,5 μ L de 10X *Buffer* (Sigma), 1,5 μ L de dNTP (1,25 μ M), 0,63 μ L de primer M13 *forward*, 0,63 μ L de primer M13 *reverse*, 9,44 μ L de água *DEPC*, 0,3 μ L de Taq polimerase e 1 μ L de DNA (amostra colônias), sob as seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 60°C, 55 segundos a 72°C e extensão por 5 minutos a 72°C. A confirmação da presença do inserto nas colônias foi verificada em gel de agarose 1,5%, em uma corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 minutos.

As colônias selecionadas foram submetidas a uma reação para serem sequenciadas no Sequenciador Automático de DNA, modelo ABI 3700 PrismABI Analyser (Applied Biosystems).

3.17 Análises das sequências geradas

Após amplificação dos insertos, as amostras foram sequenciadas e, então submetidas ao programa de alinhamento *blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). A partir dos resultados do *blast*, apenas com o banco obtido de *RefSeq* (Sequências de Referência) foram selecionadas as sequências que no alinhamento apresentaram no mínimo 90% do comprimento da sequência alvo. Devido ao critério de seleção adotado, os genes selecionados do *blast* podem ser considerados homólogos às sequências encontradas nas bibliotecas.

A seleção dos genes para a validação por PCR quantitativo em tempo real foi realizada a partir de estudos das funções e processos que o gene está envolvido de acordo com os termos do *Gene Ontology (GO)*, e tendo como embasamento o tema do projeto de pesquisa. Após a seleção dos seis genes, foram confeccionados os iniciadores no *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems™) (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e sua especificidade foi verificada no *blat* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). Foram escolhidos os genes que, após verificação no *blat*, apresentavam complementaridade somente com o gene alvo. Os parâmetros utilizados pelo programa *Primer Express* para a elaboração dos oligonucleotídeos foram: amplificar fragmentos cujo peso molecular variasse entre 80 e 120 pb, apresentasse teor de GC entre 30 e 80%, não apresentasse complementaridade entre si e apresentasse temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C.

As bibliotecas geradas também foram submetidas à análise pelo *software Ingenuity Systems*®, (Karagiannis et al., 2013) com o objetivo de relacionar os genes encontrados como diferencialmente expressos com as funções biológicas e os processos no qual eles estão envolvidos e avaliar quais as principais redes de interação entre eles. Esse programa é um banco de dados curado, construído com base em milhares de artigos científicos, livros e outras bases de dados disponíveis, por cientistas altamente qualificados.

3.18 PCR quantitativa (RT-qPCR)

As reações foram realizadas em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o sistema *SYBR Green*. Nossas amostras foram compostas do controle (sem tratamento) e submetidas ao tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10 µg/mL por 72 horas. Os iniciadores específicos para cada transcrito foram desenhados com a ferramenta *Primer3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), conforme a seguir na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores para os genes de interesse.

Oligonucleotídeo	Sequência
HIF1A <i>right</i>	5' TCCTCACACGCAAATAGCTG 3'
HIF1A <i>left</i>	5' TGCTCATCAGTTGCCACTTC 3'
ID1 <i>right</i>	5' TAGTCGATGACGTGCTGGAG 3'
ID1 <i>left</i>	5' AACCGTGCTGCTCTACGACA 3'
LDHA <i>right</i>	5' GCCGTGATAATGACCAGCTT 3'
LDHA <i>left</i>	5' TGGCAGCCTTTTCCTTAGAA 3'
NCOA3 <i>right</i>	5' AAGTCCCCACACCTTCACTG 3'
NCOA3 <i>left</i>	5' TTCTGGCAATACTGGGAACC 3'
RAB13 <i>right</i>	5' CTGCAAAGCGAATGATCAGA 3'
RAB13 <i>left</i>	5' AGCCTACGACCACCTCTTCA 3'
TPT1 <i>right</i>	5' TAGAGCAACCATGCCATCTG 3'
TPT1 <i>left</i>	5' GCTGCAGAACAAATCAAGCA 3'

A eficiência de amplificação para os iniciadores utilizados foi estimada pela realização de uma curva padrão, compreendida de reações de PCR em tempo real, contendo cDNA submetido a diluições seriadas (1, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4). Para cada par de iniciadores, foi utilizada uma amostra de cDNA correspondente ao grupo controle. As reações foram realizadas em triplicatas para cada uma das diluições do cDNA. A partir dos Ct (*Cycle threshold*) obtidos, foi possível determinar os valores de eficiência de amplificação para cada par de iniciadores utilizados, os quais devem estar próximos de 100%. Variações de 10% a mais ou a menos são aceitáveis (RASMUSSEN, 2001).

As reações foram preparadas em triplicata, incluindo o controle endógeno, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e beta actina (*ACTB*) e processadas em volume final de 20 µl contendo 100 a 500 ng de cDNA, SYBR® Green PCR Master Mix e 100 nM de cada primer, segundo protocolo da Applied Biosystems.

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

Para a análise da expressão gênica foram calculados os valores do Ct (*Cycle threshold*)* de cada amostra, utilizando-se as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o Δ Ct a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle interno (controle endógeno). Para o cálculo do Δ - Δ Ct, foi escolhida a amostra controle como calibrador, sendo atribuído ao mesmo o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio Δ Ct. Na outra amostra (tratada com ANXA1_{Ac2-26}), o resultado do Δ - Δ Ct foi calculado a partir das diferenças dos valores de Δ Ct da amostra tratada em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o $2^{-(\Delta-\Delta Ct)}$. Finalmente, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 2 (Log2).

Foi considerado aumento ou redução significativa de expressão quando o valor de expressão foi duas vezes maior ou menor, respectivamente, em relação à amostra controle ou quando esteve acima ou abaixo de 1 quando apresentado na forma de Log2.

* *Cycle threshold* ou Ct é o ciclo no qual as amostras atingem o ponto de detecção da fluorescência pelo equipamento.

4. RESULTADOS

4.1 Morfologia Celular

Inicialmente as células SiHa, foram cultivadas e observadas na microscopia de contraste de fase. Essas células apresentam aspecto fusiforme e núcleo de posição central, eucromático e com vários nucléolos, caracterizando uma célula de alta atividade metabólica (Figura 4A). Nas células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], não houve alteração morfológica, e os prolongamentos citoplasmáticos foram observados com maior nitidez devido à menor proliferação celular (Figura 4B).

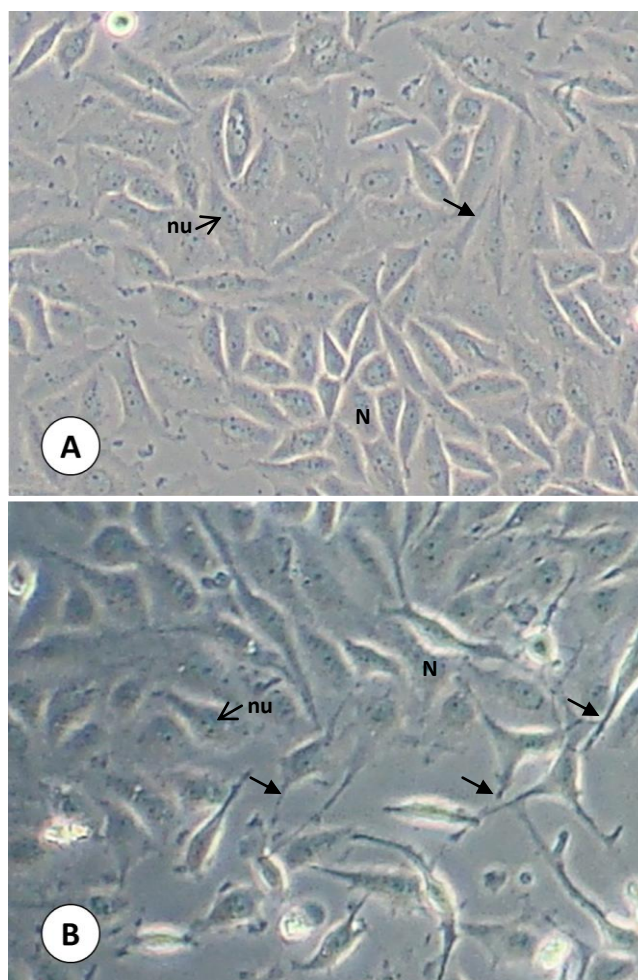


Figura 4. Análise da morfologia da linhagem celular SiHa (A) Controle e (B) tratada com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. N: núcleo; nu: nucléolo; setas: prolongamentos citoplasmáticos. Aumento de 400X.

4.2 Índice de Proliferação Celular

As células apresentaram um crescimento progressivo com o passar do tempo (Figura 5), desta maneira pode-se avaliar a diferença de crescimento entre controle e tratadas com peptídeo anti-inflamatório (ANXA1_{Ac2-26}) nos diferentes tempos (2, 4, 24,

48 e 72 horas). A análise estatística foi realizada usando o programa *GraphPad Prism 5 Instat* (GraphPad Software).

No projeto original foram propostos seis tempos diferentes. No entanto, a primeira curva de crescimento realizada mostrou que não houve diferença significativa na primeira hora após o tratamento, por ser um tempo muito próximo da adição do peptídeo. Dessa forma, os experimentos posteriores passaram a ter cinco contagens. Ainda na primeira curva, não houve diferença estatística significativa entre as células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, na concentração de 5µg/mL, e não tratado. Assim sendo, realizou-se uma nova curva de crescimento alterando a concentração do peptídeo para 10µg/mL, a qual se mostrou significativa estatisticamente (Figura 5).

O tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} reduziu a quantidade de células vivas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, em relação ao controle, conforme mostra Figura 6. Pode-se concluir, a partir do ensaio de proliferação celular e do teste estatístico aplicado, usando o programa *GraphPad Prism 5 Instat* (GraphPad Software), que o tempo de 72 horas foi o mais significativo estatisticamente, considerando valor $P \leq 0,05$.

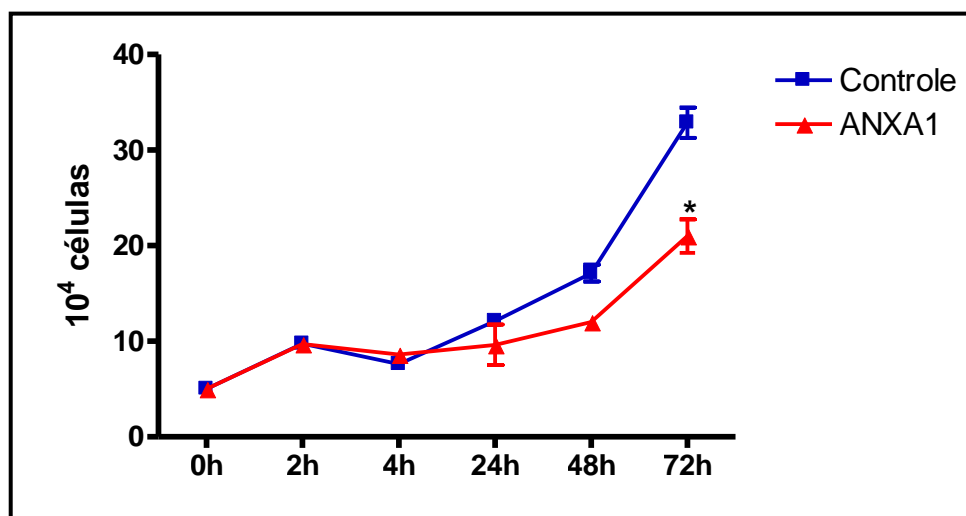


Figura 5. Curva de crescimento da linhagem SiHa nos cinco diferentes tempos e tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, na concentração de 10µg/mL. * $p \leq 0,05$.

4.3 Imunocitoquímica ultraestrutural

A expressão da ANXA1 foi investigada nas células SiHa em condições controle e após o tratamento do peptídeo no período de tempo de 72 horas, por meio da técnica de imunocitoquímica ultraestrutural pós-inclusão, usando o anticorpo LCPS1 (detecta a isoforma clivada da ANXA1). O estudo qualitativo mostrou imunorreatividade da ANXA1 nas células. A expressão dessa proteína foi observada no citoplasma, na

membrana plasmática e no núcleo das células do grupo controle (Figura 6A) e tratadas com o peptídeo (Figura 6B). Nenhuma imunomarcação foi detectada nas secções utilizadas como controle da reação (CR), incubadas com PBEA sem o anticorpo primário (Figura 6C).

As análises quantitativas das partículas de ouro associadas à ANXA1 mostrou que a expressão dessa proteína diminuiu após o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, no tempo de 72 horas (Figura 6D).

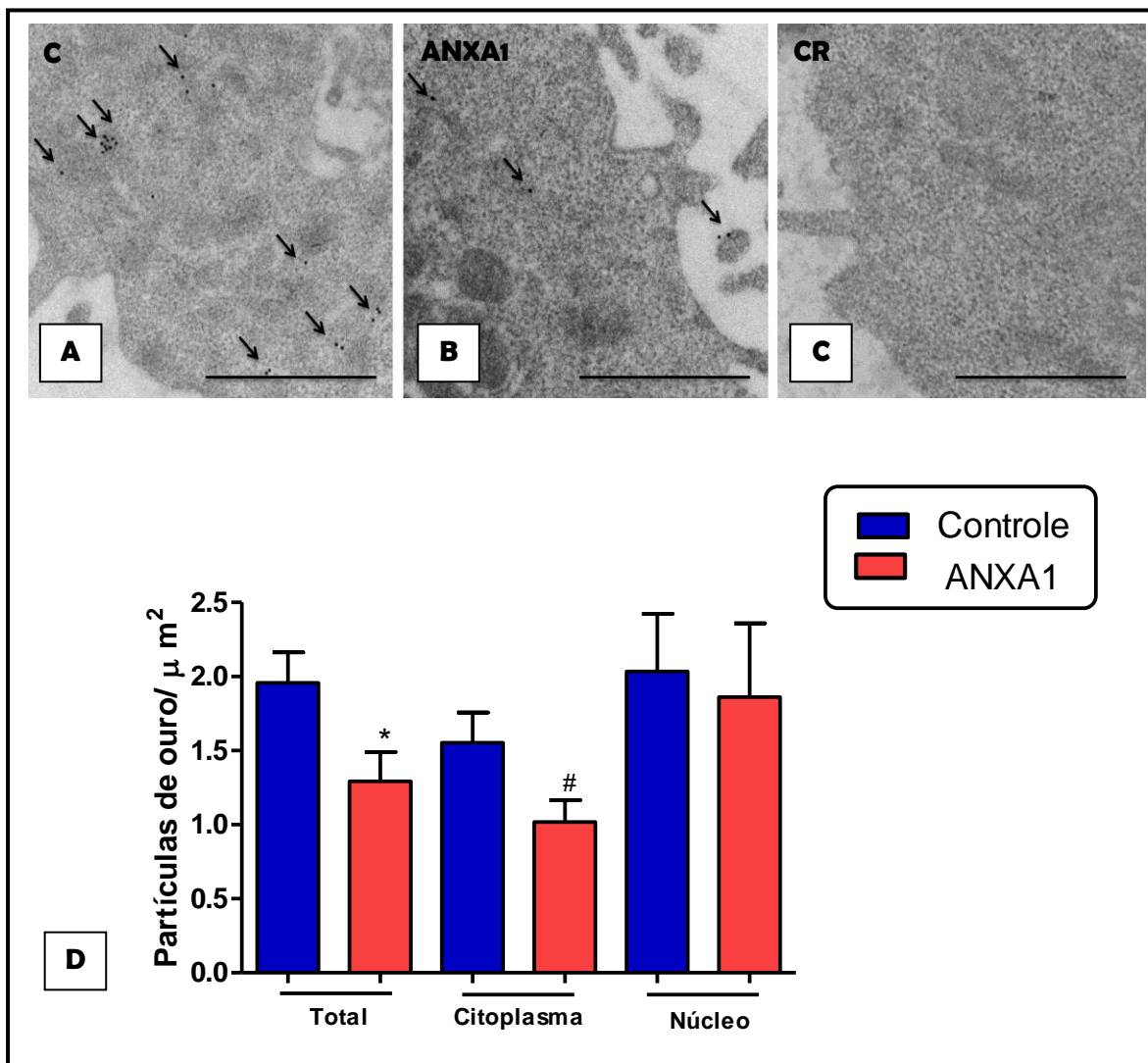


Figura 6. Detecção imunocitoquímica ultraestrutural da localização subcelular da proteína ANXA1 nas células SiHa tratadas ou não com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. Imunomarcação com partículas de ouro (ANXA1) nas células controle (C) e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} por 72 horas. Grupo controle mostra intensa imunorreatividade da proteína [A] em comparação às células tratadas [B]. Ausência de imunorreatividade para ANXA1 em células utilizadas como controle da reação (CR) [C]. Barra: 1μm. Gráfico: densidade das partículas de ouro coloidal associadas à proteína ANXA1. Os dados representam as médias ± SEM de 24 células analisadas por grupo. *P<0.05 versus grupo controle total e #P<0.05 versus grupo controle citoplasma.

4.4 Extração de RNA total

O RNA, obtido após realização da técnica de extração, foi quantificado em NanoDrop (Tabela 3) e observada a integridade desse por uma corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 minutos em gel de agarose a 1% (Figura 7) para a visualização das duas bandas ribossomais, 28S (superior) e 18S (inferior), certificando assim quantidade suficiente e qualidade desse RNA para prosseguir com os experimentos.

Tabela 3. Quantificação do RNA total em NanoDrop®.

Células SiHa	Quantificação ng/ μ L
Controle	1827,5
Tratada ANXA1	1703,4

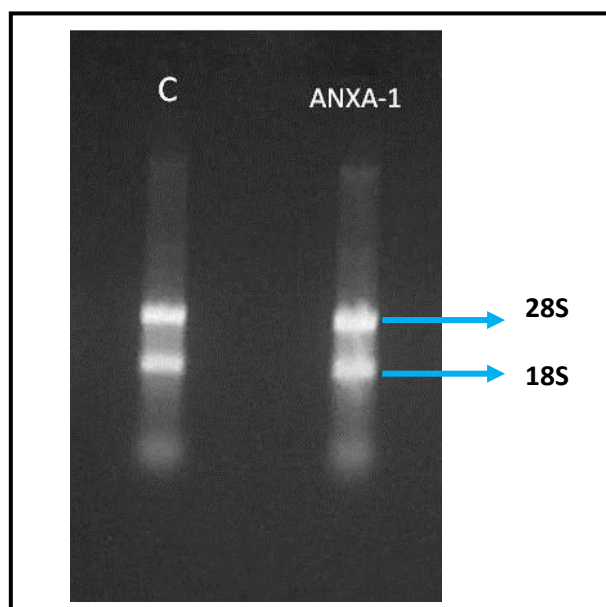


Figura 7. Foto do gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, mostrando a presença das duas bandas ribossomais 28S e 18S. C: células SiHa controle; ANXA1: células SiHa tratada com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}.

4.5 Síntese de cDNA primeira fita

Posteriormente a extração do RNA e análise de integridade do mesmo, foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA. Para isso, foi utilizado 10 µg do RNA total das células controle e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, para a utilização na tecnologia de RaSH e 5 µg do RNA total das células controle e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} para futura validação em PCR em tempo real. A comprovação da síntese da primeira fita do cDNA se deu por meio da amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene constitutivo *ACTB* (β -actina) (Figura 8).

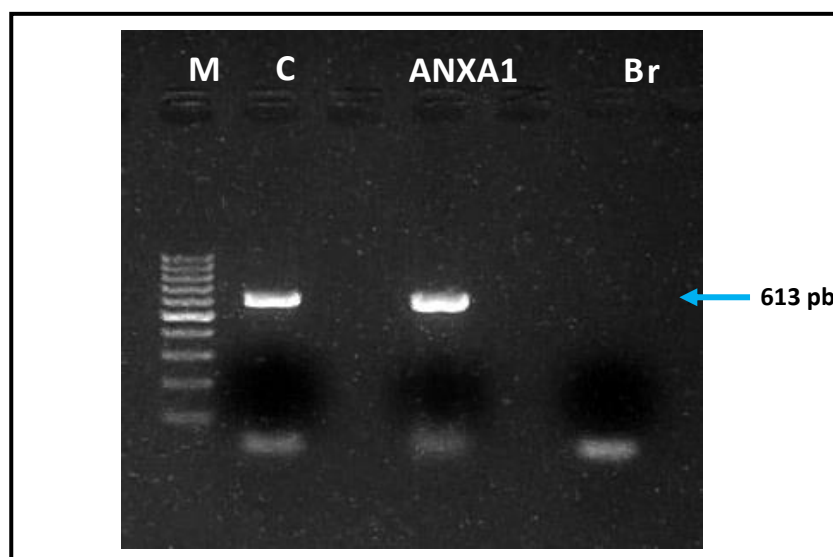


Figura 8. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, mostrando o amplificado do cDNA referente ao gene β -actina (banda de 613 pares de base). M: marcador molecular de 100pb; C: células SiHa controle ; ANXA1: células SiHa tratada com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}; Br: branco.

4.6 Síntese de cDNA segunda fita

A partir da primeira fita do cDNA foi sintetizado a segunda fita e validada com o gene constitutivo *GAPDH*, confirmada pela corrida eletroforética de 80V por aproximadamente 40 minutos em gel de agarose a 1,5%. (Figura 9).

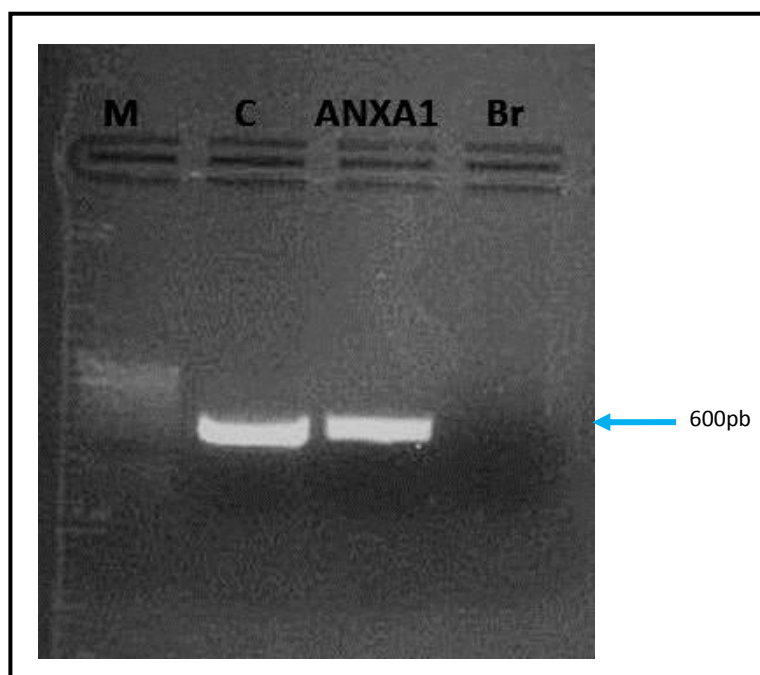


Figura 9. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, mostrando o amplificado da segunda fita de cDNA referente ao gene *GAPDH* (banda de 600 pares de base). M: marcador molecular de 100pb; C: células SiHa controle ; ANXA1: células SiHa tratada com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}; Br: branco.

4.7 Digestão do cDNA pela endonuclease de restrição *MboI*

Após a síntese do cDNA fita dupla, esses foram submetidos a digestão enzimática com a endonuclease de restrição *Mbo I*. Observou-se que, após a fragmentação do cDNA, houve a presença de uma arraste, como demonstrado no gel de agarose 1,5% (Figura 10).

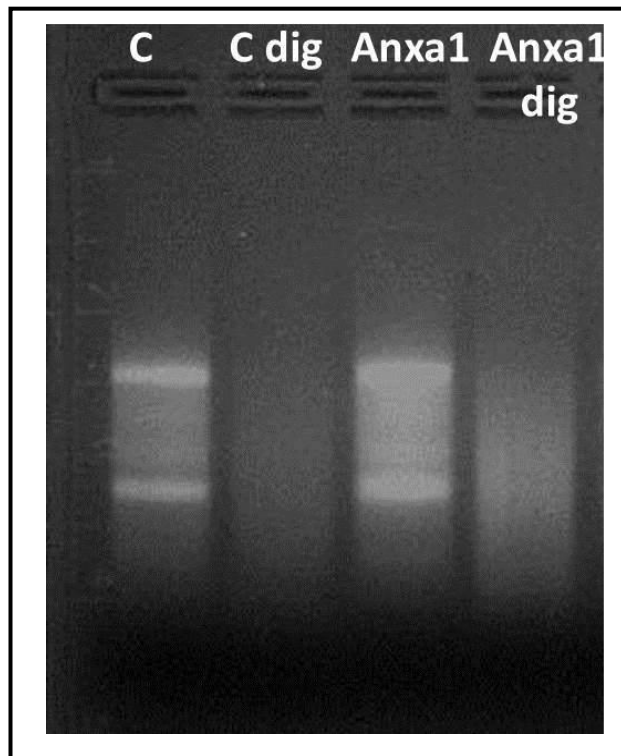


Figura 10. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, para a verificação da digestão com a enzima *MboI*. C: células SiHa controle, antes da digestão; C dig: controle após digestão; ANXA1: células SiHa tratada com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, antes da digestão; ANXA1 dig: após digestão.

4.8 Ligações dos adaptadores aos fragmentos gerados

As sequências adaptadoras XDPN-14 (5' CTGATCACTCGAGA 3') e XDPN-12 (5' GATCTCTCGAGT 3') (JIANG *et al.*,2000), contendo um sítio de restrição para a enzima *XhoI*, foram adicionadas às amostras digeridas de cDNA.

Para verificar a ligação dos adaptadores foi realizada uma reação de PCR com o oligonucleotídeo XDPN-18 (5' CTGATCACTCGAGAGATC 3') (JIANG *et al.*,2000) o qual é complementar as sequências dos adaptadores XDPN-14 e XDPN-12. Por meio da corrida eletroforética, observou-se as bandas nitidamente (Figura 11).

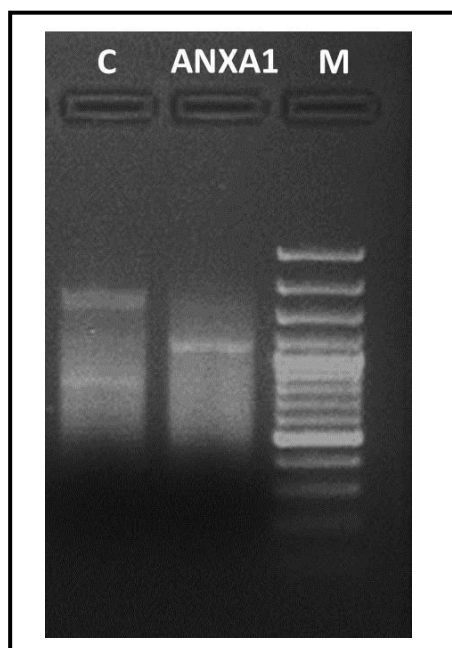


Figura 11. Foto do gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, referente a ligação dos adaptadores. C: células SiHa controle; ANXA1: células SiHa tratada com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}; M: marcador λ X174.

Após a obtenção de maior massa do produto, realizada com 20 reações de PCR, conforme descrita acima, juntaram-se as 20 reações e quantificou-as em NanoDrop, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 4. Quantificação do amplificado em NanoDrop.

Amostras	Quantificação ng/ μ l
Controle	243,1
ANXA1	466,9

4.9 Hibridização e construção das bibliotecas subtrativas

Em função da importância no entendimento do efeito da Anexina A1 na expressão gênica, utilizou-se a técnica de hibridização subtrativa rápida (RaSH), para identificarmos genes diferencialmente expressos em amostras de células SiHa controle, sem manipulação e, tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. Para isso, foram utilizados 5 μ g de amostra *driver*, para 100 ng de *tester*. Assim, cada molécula *tester* teve, portanto, 50 vezes mais chances de se hibridizar com moléculas *driver* do que com outras moléculas *tester*. Isso foi realizado para diminuir a

geração de falso-positivos e obter genes que estejam presentes exclusivamente na amostra *tester*.

Pela metodologia de clonagem foram obtidas 82 sequências de qualidade (pelo banco de dados *Blast*), que após rigorosas seleções e classificações (pelo banco de dados Gene) resultaram em 55 genes indicados como diferencialmente expressos. Essa tecnologia compara dois experimentos, com o intuito de encontrar diferenças de expressão gênica.

No nosso trabalho obtivemos duas bibliotecas subtrativas (Sub I e Sub II), os 23 genes encontrados na “Sub I” (Tabela A Anexo 1) estavam expressos na linhagem celular SiHa controle e, portanto com expressão reduzida nas células tratadas com ANXA1 e os 32 genes encontrados na “Sub II” (Tabela B Anexo 1) apresentaram expressão aumentada após tratamento com a ANXA1. Assim, o esperado é que a expressão dos genes de uma biblioteca esteja diminuída em relação à outra. Nas bibliotecas obtidas foram encontrados genes com diferentes funções e processos, descritas nos bancos de dados do *Gene Ontology (GO)*, como mostrado nas tabelas A e B (Anexo 1).

Os genes selecionados pela técnica de RaSH também foram analisados pelo *software Ingenuity Systems*®, o qual relacionou-se várias funções importantes para o processo tumorigênico, tais como apoptose, proliferação celular, reparo ao DNA, controle do ciclo celular, angiogênese, transporte molecular e morfologia celular.

A análise pelo *software* também permitiu observar a interação dos genes encontrados nas bibliotecas, com diferentes redes funcionais. Os dados mostram como eles interagem uns com os outros, e, ainda, com genes importantes nos processos tumorigênicos e inflamatórios. Em relação à biblioteca subtrativa I (Sub I), os diferentes genes encontrados estão relacionados com tumorigênese, apoptose, proliferação celular e necrose, formando uma rede de interação importante com outros genes tais como *NF-kB*, *Ubiquitin* e *HSP* (Figura 12). Em relação à biblioteca subtrativa II (Sub II), os genes diferencialmente expressos encontrados formam redes funcionais associadas ao câncer, doenças inflamatórias, ciclo celular, senescência, replicação e morte celular (Figura 13).

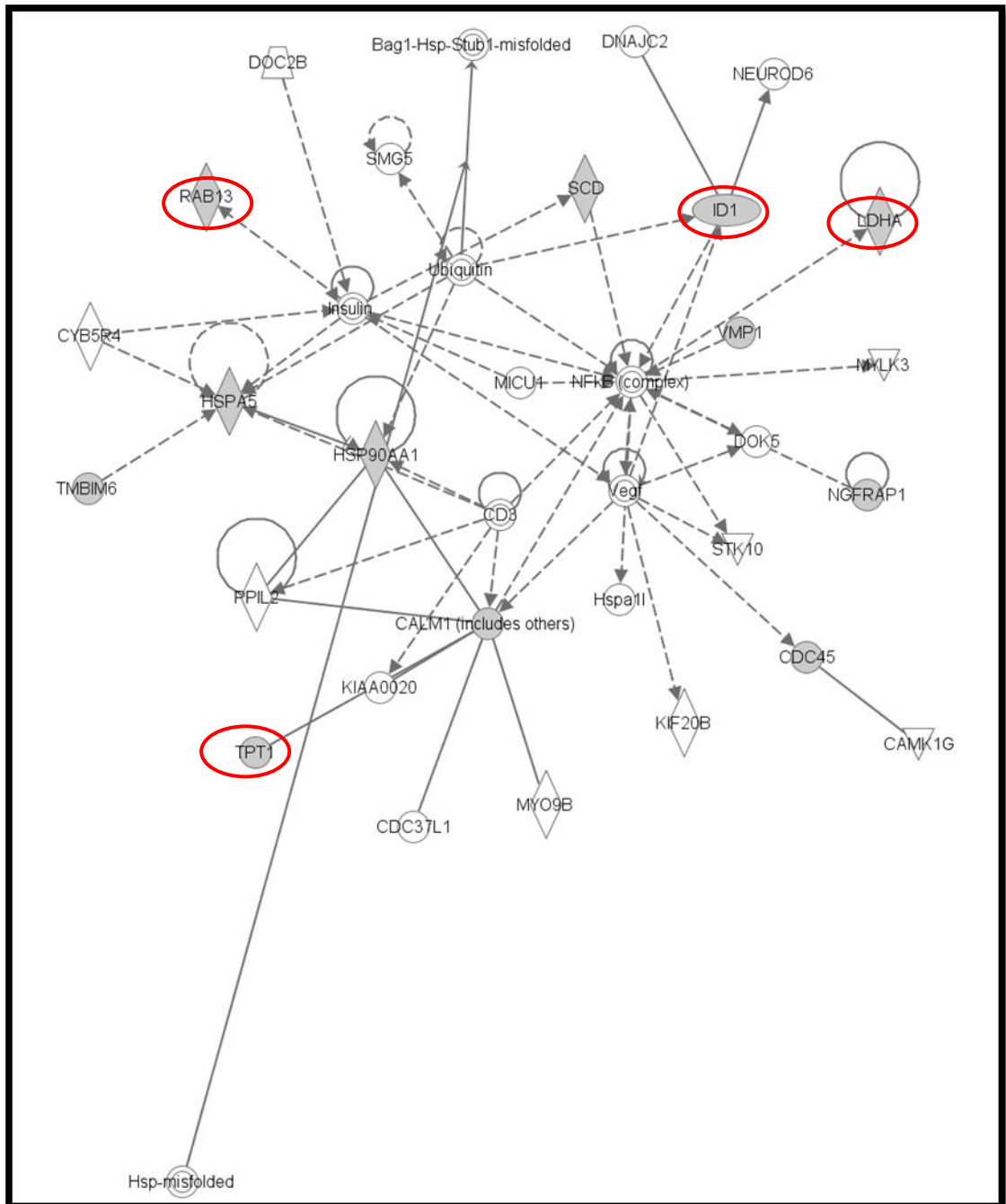


Figura 12. Relação dos genes obtidos na subtração das células controle (SUB I). O software *Ingenuity Systems* revela uma rede de interações gênicas relacionados com tumorigênese, apoptose, proliferação celular e necrose. Genes escolhidos para validação: circulado em vermelho.

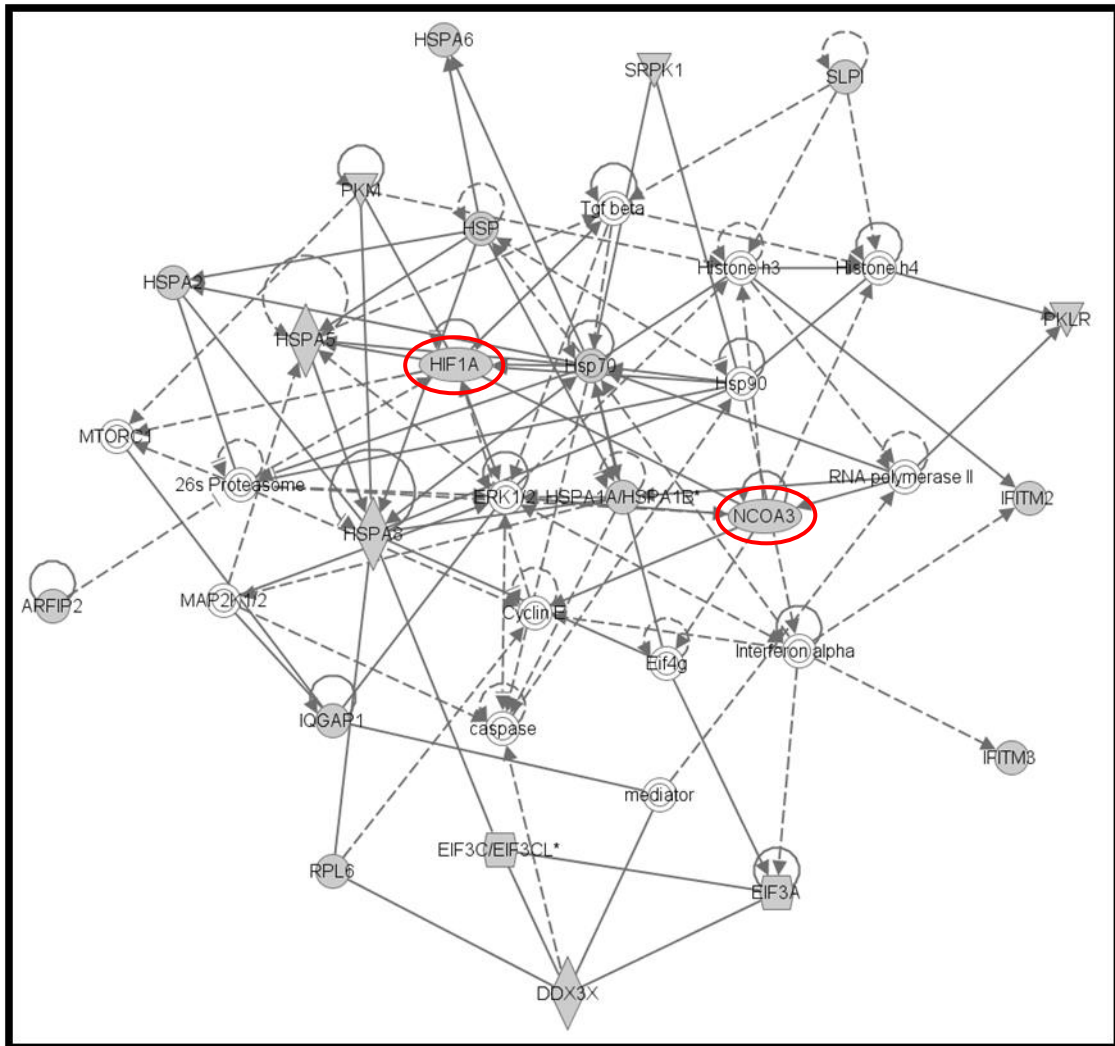


Figura 13. Relação dos genes obtidos na subtração das células tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} (SUB II). O software *Ingenuity Systems* revela uma rede de interações gênicas associadas ao câncer, doenças inflamatórias, ciclo celular, senescência, replicação e morte celular. Genes escolhidos para validação: circulos em vermelho

Após todas essas análises, foram escolhidos seis genes (*HIF1A*, *ID1*, *LDHA*, *NCOA3*, *RAB13*, *TPT1*) para a validação por PCR quantitativo em tempo real, pois esses estão relacionados com a regulação da angiogênese, processo apoptótico, glicólise, regulação da expressão gênica, replicação DNA e homeostase do íon cálcio, respectivamente (Tabela 5). Além disso, esses genes foram escolhidos para a validação, por estarem relacionados na mesma rede de interações gênicas.

Tabela 5. Descrição dos genes analisados. Informações referentes a funções e processos de que participam.

Nome do gene	NM	Símbolo	Localização cromossômica	Funções	Processos
Fator de indução de hipóxia 1-alfa	NM_001530.3	HIF1A	14q23.2	Ligante de enzima e de proteína; Proteína ligante da atividade do fator de transcrição	Via de sinalização Nocth; Angiogênese; Transporte axônico de mitocôndria; Resposta celular a hipóxia; Homeostase da glicose
Ibinidor de ligante de DNA-1, proteína dominante negativo helix-loop-helix	NM_002165.3	ID1	20q11	Ligante de proteína; Atividade do fator de transcrição ligante DNA sequência específica	Angiogênese; Processo apoptótico; Morfogênese endotelial celular; Regulação negativa da atividade do fator de transcrição do ligante sequencia DNA específica; regulação da cascata MAPK
Lactato desidrogenase A	NM_005566.3	LDHA	11p15.4	Atividade lactato-desidrogenase; Ligante de nucleotídeo; Interação com HIV	Processo metabólico do carboidrato celular; Glicólise; Processo metabólico do piruvato
Receptor nuclear coativador-3	NM_181659.2	NCOA3	20q12	Ligante do receptor androgênico; Ligante de receptor nuclear de hormônio; Ligante N-terminal de proteína; Atividade de transdutor de sinal	Via de sinalização do receptor androgênico; Processo metabólico lipídico celular; Regulação positiva da expressão gênica; Regulação positiva da transcrição a partir do promotor da RNA polimerase II; Desenvolvimento da vagina
Membro da família do oncogene RAS	NM_002870.2	RAB13	1q21.2	Ligante GTP; Atividade GTPase	Adesão celular; Transdução de sinal mediada por pequena GTPase; Transporte mediado por vesícula; Replicação DNA; Checkpoint de replicação de DNA; Transição G1/S e M/G1 do ciclo celular mitótico
Proteína tumoral, transducionalmente controlado-1	NM_003295.2	TPT1	13q14	Ligante íon cálcio; Ligante do fator de transcrição	Transporte íon cálcio; Homeostase do íon cálcio celular; Regulação negativa do processo apoptótico; Resposta à vírus.

4.10 PCR quantitativa (RT-qPCR)

Antes da realização da RT-qPCR com os genes escolhidos foi realizada uma curva padrão para obter a eficiência dos primers, compreendida de reações de PCR em tempo real, contendo cDNA controle submetido a diluições seriadas (1, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4). As reações foram realizadas em triplicatas para cada uma das diluições do cDNA. A partir dos Ct (Cycle threshold) obtidos, foi possível determinar os valores de eficiência de amplificação para cada par de iniciadores utilizados, sendo considerados aceitáveis valores de 90% a 110%.

Os genes selecionados para validação (*HIF1A*, *ID1*, *LDHA*, *NCOA3*, *RAB13*, *TPT1*) estão envolvidos em cascatas relacionadas com angiogênese, metástase, atividade lactato-desidrogenase, regulação da expressão gênica, adesão celular, ligante e transporte de íon cálcio, respectivamente.

Pelas análises do RaSH, sugere-se a expressão reduzida de quatro genes (*ID1*, *LDHA*, *RAB13* e *TPT1*) e aumentada de dois genes (*HIF1A* e *NCOA3*) nas células SiHa submetidas ao tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. No entanto, no experimento de PCR quantitativo, apenas o gene *ID1* apresentou redução significativa da expressão nessas células após tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, (Figura 14). Os demais genes apresentaram oscilação na expressão gênica, porém não significantes estatisticamente, provavelmente porque apesar do peptídeo interagir com a célula não modifica quantitativamente a expressão dos genes escolhidos.

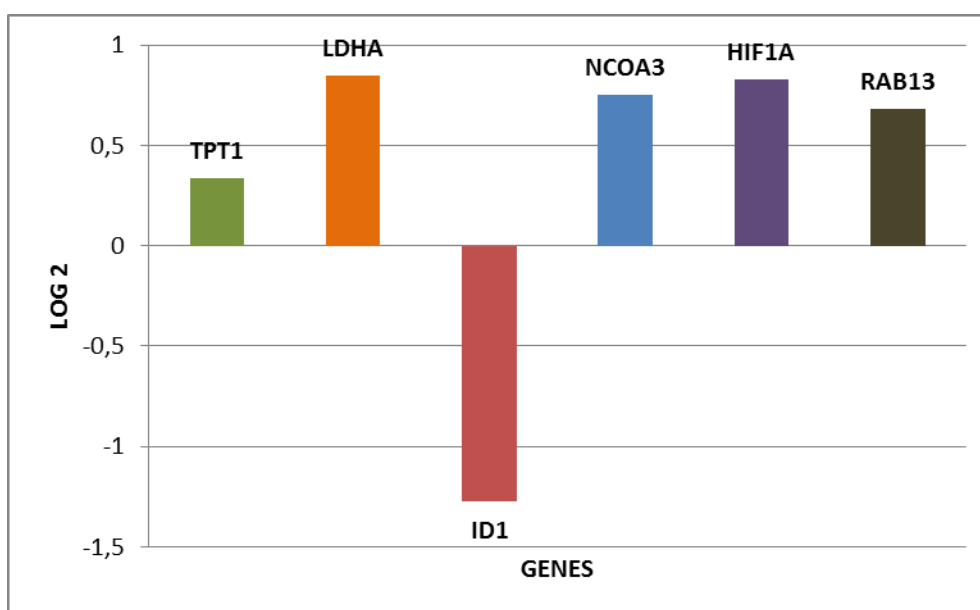


Figura 14. Expressão gênica por PCR em tempo real. Expressão dos genes *HIF1A*, *ID1*, *LDHA*, *NCOA3*, *RAB13*, *TPT1* nas células SiHa tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicatas para confirmar os resultados e os dados representados em logaritmo base 2. Foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

O colo uterino é tanto uma sentinela para infecções potencialmente sérias do trato genital superior quanto um alvo de vírus e outros carcinógenos que podem levar a um carcinoma invasivo (ROBBINS e COTRAN, 2010). Embora o câncer de colo de útero possa ser prevenido, ainda representa um grande problema de saúde pública para as mulheres, principalmente em países subdesenvolvidos onde há pouco serviço de acompanhamento e prevenção. O carcinoma cervical uterino representa o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres, sendo a associação com a infecção pelo HPV bem documentada, representando 90% dos casos de câncer cervical (FRANCO et al., 2003; JEMAL et al., 2011; JAAFAR et al., 2009; WALBOOMERS et al., 1999) nesse contexto salientamos a importância de se estudar este tipo de câncer.

Na fase inicial, esse tipo de tumor maligno pode ser tratado com cirurgia ou radioterapia, no entanto a taxa de sobrevivência de até um ano permanece entre 10 e 15% (LANDONI et al., 1997). Por essa razão, o desenvolvimento de novas formas de tratamento com alvos específicos e efetivos continuam sendo necessários.

Uma das indicações de tratamento é a proteína anti-inflamatória anexina A1 (ANXA1), que apesar de existir uma ampla literatura sobre seus efeitos farmacológicos e dos seus peptídeos miméticos nos processos inflamatórios *in vitro* (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008) e *in vivo* (GASTARDELO et al., 2009; FACIO et al., 2011), a expressão dessa proteína na carcinogênese cervical tem sido pouco investigada. Um estudo detectou diminuição nos níveis dessa proteína e do seu RNAm em neoplasia intraepitelial cervical, concluindo que a ANXA1 pode ser considerada um marcador biológico na detecção da progressão do câncer cervical invasivo (LEE et al., 2008). Em outro estudo, Shen e colaboradores (2010) detectou a baixa expressão da ANXA1 em células SiHa, tratadas com complexo citrato lantanun, sugerindo um papel dessa proteína na via de apoptose regulando os fatores de crescimento relacionados. Dessa maneira, verificamos a ação da ANXA1 sobre as células SiHa (derivada de células de carcinoma epidermóide de cérvix), uma linhagem que nos forneceria melhores condições para os experimentos. Estas células contém o HPV16, sendo estimada cerca de 10 cópias do DNA HPV16 integrado ao DNA celular (YEE et al, 1985).

No presente trabalho, analisando as células cultivadas da linhagem celular SiHa, observamos que a morfologia não sofreu alteração após o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, no entanto, a proliferação celular diminuiu após 72 horas de tratamento.

No trabalho de Alldridge e Bryant (2003) eles mostraram que a ANXA1 inibe a proliferação celular em tipo celulares diversos, quando utilizaram RNAi provocando o

aumento da expressão desta proteína, propondo que a ANXA1 pode inibir a proliferação celular pela indução da desorganização citoesquelética e concomitantemente inibição da ciclina D1 mediada pela modulação da ativação da cascata ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*). Em outro estudo, pesquisadores analisaram a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), quando estimuladas com estrógeno e a regulação desse hormônio pela ANXA1, onde observaram que essa proteína apresentou efeito antiproliferativo, indicando seu possível papel como supressor tumoral e modulador das funções proliferativas do estrógeno (ANG et al., 2009). Como o colo de útero sofre influência do estrógeno também, podemos supor que a proteína ANXA1 pode modular este hormônio, controlando a proliferação celular e impedindo a progressão tumoral.

A expressão e localização intracelular da proteína ANXA1, nas células SiHa, foram investigadas pela microscopia eletrônica de transmissão, cujos resultados mostraram imunorreatividade na membrana plasmática, núcleo e citoplasma nessas células. Pela análise estatística observamos que a expressão da proteína diminuiu após o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. O que pode ser atribuído ao fato de alta demanda ou *feedback* negativo. Esse resultado foi consistente com o trabalho de Girol e colaboradores (2013), onde observaram expressão da ANXA1 no epitélio da córnea, íris, retina e processos ciliares de ratos durante o processo de inflamação ocular, no entanto, houve diminuição dessa proteína nos grupos tratados com o peptídeo. Esses dados confirmam o papel da ANXA1 na fisiologia das células SiHa durante o processo neoplásico.

Com o objetivo de entender melhor o efeito da ANXA1 na expressão gênica, utilizamos a técnica de hibridização subtrativa rápida (RaSH), que isola genes diferencialmente expressos, incluindo novos genes e transcritos raros. Esta técnica apresenta vantagem em relação às demais técnicas de hibridização subtrativa, pois simplifica os passos de hibridização e subtração. Além disso, é eficiente na diminuição de falso-positivos, apresentando também um menor custo (JIANG et al., 2000). As subtrações foram realizadas em amostras de células SiHa sem tratamento e após o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. Os resultados obtidos mostraram, pela primeira vez na literatura, que a expressão gênica nas células SiHa é alterada após o tratamento com esse peptídeo.

Na técnica RaSH foram utilizadas duas bibliotecas gênicas: SUB I (driver=SiHa tratada com ANXA1_{Ac2-26} *versus* tester= SiHa sem tratamento {controle}) e SUB II

(driver= SiHa sem tratamento *versus* tester= SiHa tratada com ANXA1_{Ac2-26}) das quais geraram 82 genes diferencialmente expressos. Ao estudar a expressão gênica de algumas proteínas citoesqueléticas, Yi e colaboradores (2013) relataram que a superexpressão da ANXA1, em células de ratos (PMVEC), suprimiu os níveis de expressão das proteínas actina-a1, tubulina-a1 e destrina. Este fato indica que a ANXA1 pode ser um inibidor de diferenciação destas células por regular a remodelação do citoesqueleto, tornando-se uma indicação terapêutica na síndrome hepatopulmonar.

Os genes selecionados para validação por PCR em tempo real foram *HIF1A*, *IDI*, *LDHA*, *NCOA3*, *RAB13* e *TPT1*, por terem funções importantes relacionadas com angiogênese, metástase, atividade lactato-desidrogenase, regulação da expressão gênica, adesão celular, ligante e transporte de íon cálcio, respectivamente. Entre esses seis genes, obtidos pela RaSH, quatro deles (*IDI*, *LDHA*, *RAB13* e *TPT1* da SUB I) era esperado mostrar expressão reduzida nas células SiHa submetidas ao tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} e dois genes (*NCOA3* e *HIF1A* da SUB II) apresentarem expressão aumentada. Porém, os cinco genes apresentaram expressão aumentada (não significante), exceto o gene *IDI* que mostrou expressão reduzida significante (-1,27279).

Apenas esse gene *IDI* é que confirmou a validação quando realizou-se a PCR quantitativa em tempo real com as células SiHa tratadas com ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL. Isso provavelmente ocorre porque os efeitos miméticos do peptídeo nessas células devem ser mais efetivos em concentrações mais elevadas. Nos experimentos com RaSH observou-se que os genes *NCOA3* e *HIF1A* poderiam ser considerados bons marcadores moleculares, por terem confirmado a expressão aumentada, apesar de não significativa (pois em log2 deveriam ter dado mais de 1), enquanto que os genes *LDHA*, *RAB13* e *TPT1* ainda exigem novos ensaios.

A seleção dos genes validados contribui para um melhor entendimento dos processos tumorigênicos. Na literatura, os níveis de expressão do gene *IDI* estão relacionados com angiogênese, diferenciação e metástase, e a superexpressão foi encontrada em carcinoma esofágico de células escamosas (LUO et al., 2012), sugerindo que, no nosso trabalho, a ANXA1 pode ter regulado este gene, diminuindo sua expressão, podendo ser utilizada como um possível alvo terapêutico. O gene *IDI* é um inibidor de diferenciação ou de ligação de DNA que pertence a uma família de pequenas moléculas de curto comprimento (13 a 20 KDa). O inibidor de diferenciação contém um domínio hélice-alça-hélice pelo qual inibe os fatores de transcrição básica de ligação ao

DNA. Desta maneira, esse gene regula os fatores de transcrição de genes alvos (BENEZRA, et al., 1990). Em um estudo, Darnel e colaboradores (2010) correlacionaram tipos de HPVs, em câncer cervical, com a expressão gênica dos genes *ID1*, onde verificaram que a expressão da oncoproteína E6 correlaciona com a expressão de *ID1* em 95% dos carcinomas cervicais invasivos, sugerindo que os HPVs de alto risco contribuem para a progressão tumoral pela regulação do gene *ID1*.

No gene *HIF1A* estudado, ressaltamos a importância da situação de hipóxia nos tumores, já que nessa região há uma redução de oxigênio disponível. Um dos principais mecanismos pelo qual as células do câncer se adaptam ao microambiente com hipóxia é por meio da atividade do gene *HIF1A* (fator-1 de indução de hipóxia, subunidade alfa). Algumas pesquisas apontam que este gene está superexpresso em mais de 70% dos tumores sólidos e é reconhecido como a principal resposta à hipóxia na transcrição de vários genes relacionados com angiogênese, metabolismo energético, invasão e metástase (JING et al, 2013; MABJEESH et al, 2003). Já outro estudo analisou o efeito do silenciamento deste gene, por RNA de interferência, em células de tumor pancreático, onde apontou que o *HIF1A* subexpresso restringiu a proliferação celular, angiogênese e metástases, mas aumentou a apoptose em tecido hipóxico (WEI et al., 2013).

Ao estudarem o carcinoma de cérvix, Kim e colaboradores (2011) concluíram que o gene *HIF1A*, além do *VEGF* (fator de crescimento endotelial vascular) e *Tβ-4* (Thymosin β4), tiveram suas expressões aumentadas nos estágios iniciais do câncer cervical, sendo que na fase 3 do desenvolvimento tumoral, a expressão do *HIF1A* teve maior elevação, sugerindo que este gene teve auto-regulação nas condições de hipóxia nos tumores maiores.

Assim, no nosso estudo, as células de carcinoma de colo de útero tratadas com ANXA1 tiveram a expressão do gene *HIF1A* aumentada. Podemos inferir então, que o tratamento com a proteína anti-inflamatória ANXA1, apesar de modificar a expressão do gene *HIF1A*, não age nessa via gênica controlando a falta de oxigenação natural em células tumorais, mas provavelmente modificando outras cascatas gênicas como aquelas relacionadas com processos inflamatórios, proliferação celular, entre outras.

O gene *LDHA* (Lactato Desidrogenase A) é uma das subunidades da Lactato desidrogenase, enzima que favorece a conversão de piruvato a lactato na via glicolítica. Nos tumores observa-se o efeito Warburg (aumento da glicólise aeróbica) e este representa uma alteração fundamental no metabolismo de energia associado com a

transformação maligna. Isso provavelmente reflete na necessidade maior de ATP pelas células devido à função celular ativa e geração de ATP mitocondrial ser insuficiente por causa de alterações intrínsecas e extrínsecas, levando o aumento na glicólise (CHEN et al, 2007). Este efeito pode influenciar a estratégia de novas terapias contra o câncer, sendo uma delas, focar o gene *LDHA*, pois sua expressão tem sido encontrada aumentada em diversos tipos de câncer humano (YAO et al., 2013). Experiências *in vivo* demonstraram que os tumores dependem da conversão da glicose a lactato para o crescimento e que a interferência nesse processo prejudica a expansão do tumor, pois a superexpressão da *LDHA* auxilia as células malignas proliferarem no microambiente tumoral. Observou-se que a tumorigenicidade foi diminuída em células deficientes de *LDHA*, demonstrando que este gene desempenha um papel fundamental na manutenção do tumor (FANTIN;ST-PIERRE;LEDER, 2006).

Dessa maneira, observamos aumento da expressão desse gene, apesar de não significativo, nas células SiHa após o tratamento com o peptídeo. Provavelmente, esse aumento ocorreu devido a uma maior necessidade de energia pelas células tumorais. Assim, inferimos que o tratamento com ANXA1 modifica a expressão do gene *LDHA*, no entanto, não interfere nas vias gênicas bloqueando sua ação e impedindo o metabolismo energético.

O quarto gene estudado, *NCOA3*, é um co-ativador do receptor de esteroides e interage com o receptor α do estrógeno, tendo sua expressão elevada em câncer de mama e sua amplificação associada com o alto grau do tumor. Observando isso, Burandt e colaboradores (2013) demonstraram a forte relação da expressão do gene *NCOA3* com o pobre prognóstico e fenótipo tumoral desfavorável em pacientes com câncer de mama. Dados apontam que este gene também pode contribuir para o desenvolvimento e crescimento do câncer endometrial, tanto de maneira dependente quanto independente de estrógeno. A expressão aumentada do *NCOA3* foi observada em pacientes com câncer endometrial uterino, podendo ser esse gene um alvo para tratamento, pois sua expressão pode estar correlacionada com a invasão, estágio clínico e dediferenciação tumoral (SAKAGUCHI et al., 2007). Em carcinomas nasofaríngeos, a expressão elevada, desse gene ,pode ser um fator importante para a aquisição do fenótipo invasivo ou metastático, já que sua expressão se mostrou alta no estágios clínicos mais avançados (LIU et al, 2008).

Após o tratamento com a proteína anti-inflamatória ANXA1, o gene *NCOA3* apresentou-se com o nível aumentado, apesar de não significativo, possivelmente pelas

células analisadas serem provenientes de um carcinoma invasivo e tendo relação direta com o hormônio estrógeno.

O outro gene analisado, o *RAB13*, é membro da família Rab de pequenas proteínas G, considerado também um membro da família do oncogene *RAS*. Este gene desempenha o papel na regulação do tráfego de membrana e codifica uma proteína que está envolvida na montagem das junções celulares (NOKES et al., 2008). Para o processo metastático ocorrer, as células devem se separar do tumor primário, principalmente por meio das junções célula-célula. Em um estudo, utilizando miRNAs (micro RNAs), o miR-19a reprimiu diretamente o *RAB13*, o qual é uma pista para a desmontagem da junção celular no câncer de próstata, favorecendo a metástase (MO et al, 2013). Outros dados fornecem evidências de que o gene *RAB13*, cuja proteína faz parte da placa citosólica nas junções de oclusão (*tight junctions*), expresso tanto em células fibroblásticas quanto epiteliais, regula o transporte vesicular durante as transições epitelial-mesenquimal e/ou mesenquimal-epitelial (MORIMOTO et al., 2005).

No nosso estudo, as células de carcinoma de colo de útero tratadas com ANXA1 tiveram a expressão do gene *RAB13* aumentada, provavelmente devido à resposta à interação célula-célula. Podemos inferir então, que o tratamento com a proteína anti-inflamatória ANXA1, apesar de modificar a expressão desse gene, não age nessa via gênica controlando a desagregação das junções celulares, mas provavelmente modificando outras cascatas gênicas.

Outro gene estudado, *TPT1* (tumor protein, translationally-controlled 1), conhecido também como *TCTP* (*Translationally controlled tumor protein*) codifica uma proteína altamente conservada de 19kDa encontrada em plantas, animais e fungos (NAGANO-ITO; ICHIKAWA, 2012). Descrito primeiramente em células tumorais de camundongos, este gene está relacionado com crescimento celular. No entanto, estudos posteriores mostraram que *TPT1* está presente nas células de vários mamíferos, incluindo tecidos normais. Os níveis de expressão protéica e mRNA deste gene tende a ser maior em canceres, quando comparados a tecidos normais, como no carcinoma hepatocelular (ZHU et al, 2008), e a inibição da expressão desse gene pode atenuar fenótipos malignos, indicando que o *TPT1* tem papel importante na tumorigênese (TUYNDER et al., 2002). Este gene codifica uma proteína de ligação de cálcio, que pode ser regulada pela concentração de Ca^{2+} em diferentes compartimentos celulares, a nível transcricional e pós-transcricional. (XU; BELLAMY;TAYLOR, 1999). A proteína

TPT1 está localizada no núcleo, citoplasma e membranas de diferentes tipos celulares, como exemplo nas células HeLa (linhagem celular de câncer cervical humano) onde predominou no núcleo (MA; ZHU, 2012). Lo e colaboradores (2012) observaram *in vitro* que a superexpressão do miR-27b diminuiu significativamente os níveis da proteína e do gene *TPT1* que foi considerado um biomarcador, contribuindo para diagnósticos precoces de câncer oral.

Ao analisar o efeito do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} nas células de carcinoma epidermóide de colo uterino, o gene *TPT1* mostrou expressão aumentada, possivelmente devido estar relacionado ao crescimento celular e a ação tumorigênica desse gene, apesar desse aumento na expressão não ser significativo.

Os genes estudados mostraram expressão diferencial nas células SiHa de uma maneira dependente do tratamento com ANXA1_{Ac2-26}. Em resumo, o presente trabalho evidencia a importância da técnica RaSH como um método eficiente e rápido para identificar genes modulados pelas ANXA1 em células de origem epitelial. Outros experimentos serão necessários para determinar se os demais genes obtidos na subtração e regulados pela ANXA1 estão casualmente relacionados com mudanças induzidas pelo tratamento com essa proteína. Pelas funções dos genes encontrados podemos observar que são importantes nos processos tumorais, passíveis de alterações mediante interações no metabolismo das células epiteliais de colo uterino. O colo de útero é um local de difícil acesso, sendo mais comum a prática cirúrgica, quimioterápica ou radioterápica para o tratamento do carcinoma cervical, no entanto novas formas terapêuticas estão em desenvolvimento, como o uso da terapia gênica associada a nanopartículas testadas em células HeLa (colo de útero), permitindo assim, a entrega de drogas nas células alvos (ZHENG et al., 2013).

Finalmente, o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} altera a proliferação e expressão gênica na linhagem celular SiHa e, essas alterações provavelmente estão relacionadas com os processos inflamatórios e tumorigênicos. Desta maneira, sugerimos que ANXA1_{Ac2-26} tem ação moduladora no metabolismo desse tipo celular. Poucas investigações tem avaliado o efeito do ANXA1_{Ac2-26} na expressão dos genes selecionado em nosso trabalho e futuros estudos moleculares serão necessários para mostrar os mecanismos de ação dessa proteína anti-inflamatória.

Análises *in vitro* mostraram que o peptídeo estudado pode ser importante nas cascatas gênicas, desempenhando um papel regulatório no desenvolvimento tumoral. Assim, nossos dados apontam a relevância de estudos futuros com as células SiHa para

o desenvolvimento de novas terapias, focando as atividades gênicas que envolvem a ação da ANXA1 e as aplicações dessa proteína como uma possível terapêutica no carcinoma cervical uterino.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a linhagem celular SiHa tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, em relação às células controles, permitem concluir:

- não modifica a morfologia celular;
- diminui a proliferação celular;
- modula a expressão gênica, pois a hibridização subtrativa rápida resulta em 82 genes diferencialmente expressos;
- reduz a expressão do gene *IDI*, validada por PCR quantitativo em tempo real, sendo considerado possível marcador molecular para carcinomas de colo de útero;
- reduz a expressão da proteína ANXA1;
- interage com as vias de sinalização celular, das quais a ANXA1 participa, formando uma rede com outros genes associados com doenças inflamatórias, imunológicas, processos metabólicos, regulação gênica e ciclo celular, relacionados pelo *software Ingenuity Systems*©.

Essas conclusões mostram que a proteína ANXA1 está presente nas cascatas de sinalização de processos inflamatórios e tumorigênicos, alterando a proliferação celular e a expressão gênica nas células. Assim, os nossos resultados apontam as células SiHa como um alvo potencial das atividades gênicas da proteína ANXA1, sendo possível sua indicação em terapias inovadoras no tratamento de carcinomas de colo uterino.

7. REFERÊNCIAS

ALLDRIDGE, L. C.; BRYANT, C. E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. **Experimental Cell Research**, New York, v. 290, n. 1, p. 93-107, Oct., 2003

ALVES, V. A. F. NONOGAKI, S.; CURY, P. M.; WÜNSCH-FILHO, V.; DE CARVALHO, M. B.; MICHALUART-JÚNIOR, P.; MOYSES, R. A.; CURIONI, O. A.; FIGUEIREDO, D. L.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; PARRA, E. R.; POLACHINI, G. M.; SILISTINO-SOUZA, R.; OLIANI, S. M.; SILVA-JÚNIOR, W. A.; NOBREGA, F. G.; HEAD AND NECK GENOME PROJECT/GENCAPO; TAJARA, E. H.; ZAGO, M. A. Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology**, Oxford, v. 53, p. 715 - 727, Dec., 2008.

ANG, E. Z. F.; NGUYEN, H. T.; SIM, H. L.; PUTTI, T.C.; LIM, L.H.K. Annexin-1 Regulates Growth Arrest Induced by High Levels of Estrogen in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 7, n. 2, p. 266-274, Feb., 2009.

BENEZRA, R.; DAVIS, R. L.; LOCKSHON, D.; TURNER, D. L.; WEINTRAUB, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. **Cell**, v. 61, n. 1, p. 49-59, Apr., 1990.

BOYER, S. N.; WAZER, D. E.; BAND, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer Research**, Chicago, v. 56, n. 20, p. 4620-4624, Oct., 1996.

BURANDT, E.; JENS, G.; HOLST, F.; JÄNICKE, F.; MÜLLER, V.; QUAAS, A.; CHOSCHZICK, M.; WILCZAK, W.; TERRACCIANO, L.; SIMON, R.; SAUTER, G.; LEBEAU, A. Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 137, n. 3, p. 745-753, Feb., 2013.

CALMON, M. F.; MOTA, M. T.; BABETO, É.; CANDIDO, N. M.; GIROL, A. P.; MENDIBURU, C. F.; BONILHA, J. L.; SILVESTRE, R. V.; ROSA, B. M.; THOMÉ, J. A.; MEDEIROS G. H.; SOARES, F. A.; GUIMARÃES, G. C.; DE ARRUDA, J. G.; OLIANI, S. M.; VILLA, L. L.; VASSALLO, J.; RAHAL, P. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n.1, Jan., 2013.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, London, v. 407, n. 6801, p. 249-257, Sep., 2000.

CHA, MIM-KYEONG; LEE, DO-KYUNG; NA, Hyang-Mi; LEE, Si-Won; SHIN, Seon-Hee; KWON, Jeong-Hyun; KIM, Kyung-Jae; HA, Nam-Joo. Antiviral activity of Bifidobacterium adolescentis SPM1005-A on human papillomavirus type 16. **BMC Medicine**, London, v. 10, n. 72, Jul., 2012.

CHEN, Z.; LU, W.; GARCIA-PRIETO, C.; HUANG, P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 39, n. 3, p. 267-174, Jun., 2007.

CHUNG, S. H. ; FRANCESCHI, S. ; LAMBERT, P. F. Estrogen and ERalpha: culprits in cervical cancer? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 21, n. 8,p. 504-511, Aug., 2010.

CIRINO, G.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; CILIBERTO, G.; ARPAIA, G.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1.**British Journal of Pharmacology**, London, v. 108, n. 3, p. 573-574, Mar., 1993.

CLEVERS, H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, Cambridge, v. 118, n. 6, p. 671-674, Sep., 2004.

CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; AGUADO, T.; FRANCESCHI, S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, London v. 89, p. 101-105, 2003.

CONDEELIS, J. ; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 2, p. 263-266, Jan., 2006.

COUSSENS, L. M. ; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 860–867, Dec., 2002.

D'ACQUISTO, F; PERRETTI, M; FLOWER, RJ. Annexin-A1: a pivotal regulator of innate and adaptive immune systems. **British Journal of Pharmacology**; v. 155, p. 152-169. 2008.

DAMAZO, A. S.; YONA, S.; D'ACQUISTO, F.; FLOWER, R. J.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 166, p. 1607-1617, Jun., 2005.

DAMAZO, A. S.; YONA, S.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, p. 4410-4418, Apr., 2006.

DARNEL, A. D.; WANG, D.; GHABREAU, L. YASMEEN, A.; SAMI, S.; AKIL, N.; AL MOUSTAFA, A. E. Correlation between the presence of high-risk human papillomaviruses and Id gene expression in Syrian women with cervical cancer. **Clinical microbiology and infection**, Paris, v. 16, n.3, p. 262-266, Mar., 2010.

DE CARLO, C. A.; ROSA, B.; JACKSON, R.; NICCOLI, S.; ESCOTT, N. G.; ZEHBE, I. Toll-Like Receptor Transcriptome in the HPV-Positive Cervical Cancer Microenvironment. **Clinical and Developmental Immunology**, Abingdon, v. 2012, p. 1-9, 2012.

ERNST, J. D.; HOYE, E.; BLACKWOOD, R. A.; JAYE, D. Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca² (+)-dependent aggregation of isolated specific granules. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 85, n. 4, p. 1065-1071, Apr., 1990.

FACIO, JR, F. N.; SENA, A. A.; ARAÚJO, L. P.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; LUZ, MAM; YU, L. ; OLIANI, S. M. Annexin 1 mimetic peptide protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 89, n. 1, p. 51-63, 2011.

FANTIN, VALERIA R.; ST-PIERRE, JULIE; LEDER, PHILIP. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. **Cancer Cell**, Cambridge, v.9, n. 6, p. 425-434, Jun., 2006.

FARROW, B.; SUGIYAMA, Y.; CHEN, A.;UFFORT, E.; NEALON, W.; MARK EVERS, B. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development: discussion. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 239, n. 6, p. 763-771, Jun., 2004.

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

FRANCO, E. L.; SCHLECHT, N. F.; SASLOW, D. The epidemiology of cervical cancer. **Cancer Journal**, Villejuif, v. 9, n. 5, p. 348-359, Sep-Oct., 2003.

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

GAVINS, F. N.; DALLI, J.; FLOWER, R. J.; GRANGER, D. N.; PERRETTI, M. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 21, n. 8, p. 1751-1758, Jun., 2007.

GAVINS, F. N.; YONA, S.; KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, New York, v. 101, n. 10, p. 4140-4147, May, 2003.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: From Structure to Function. **Physiol Rev** ; v. 2, p. 331-371, 2002.

GIBBS, L.; CAROLLO, M. G.; DAMAZO, A. S.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. . Time-dependent expression of annexin 1 in a model of chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel, v. 51, n. 6, p. 300-306, Jun., 2002.

GIL, C. D.; 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 biology international**, London, v. 30, n. 4, p. 338-344, Mar., 2006.

GIROL, A. P.; MIMURA, K. K. O.; DREWES, C. C.; BOLONHEIS, S. M.; SOLITO, E.; FARSKY, S. H. P.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M. Anti-Inflammatory Mechanisms of the Annexin A1 Protein and Its Mimetic Peptide Ac2-26 in Models of Ocular Inflammation In Vivo and In Vitro. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 190, n. 11, p. 5689-5701, Jun., 2013.

GOULDING, N. J.; GODOLPHIN, J. L.; SHARLAND, P. R.; PEERS, S. H.; SAMPSON, M.; MADDISON, P. J.; FLOWER, R. J. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. **Lancet**, London, v. 335, n. 8703, p. 1416-1418, Jun., 1990.

GRETEN, F. R.; ECKMANN, L.; GRETEN, T. F.; PARK, J. M.; LI, Z. W.; EGAN, L. J.; KAGNOFF, M. F.; KARIN, M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, Cambridge, v. 118, n. 3, p. 285-296, Aug., 2004.

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**, Basingstoke, v. 25, n. 17, p. 2444-2451, Apr., 2006.

JAAFAR, F.; RIGHI, E.; LINDSTROM, V.; NOHADANI, M.; VAN NOORDEN, S.; LLOYD, T.; POZNANSKY, J.; STAMP, G.; DINA, R.; COLEMAN, D. V.; POZNANSKY, M. C. Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. . **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 175, n. 4, p. 1525-1535, Oct., 2009.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: Cancer Journal of Clinicians**, New York, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr., 2011.

JIANG, H.; KANG, D. C.; ALEXANDRE, D.; FISCHER, P. B. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 23, p. 12684-12689, Nov., 2000.

JING, S. W.; WANG, Y. D.; CHEN, L. Q.; SANG, M. X.; ZHENG, M. M.; SUN, G. G.; LIU, Q.; CHENG, Y. J.; YANG, C. R. Hypoxia suppresses E-cadherin and

enhances matrix metalloproteinase-2 expression favoring esophageal carcinoma migration and invasion via hypoxia inducible factor-1 alpha activation. **Diseases of the esophagus**, Milano, v. 26, n. 1, Jan., 2013.

KAEWPRAG, J.; UMNAJVIJIT, W.; NGAMKHAM, J.; PONGLIKITMONGKOL, M. HPV16 Oncoproteins Promote Cervical Cancer Invasiveness by Upregulating Specific Matrix Metalloproteinases. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 8, e71611, Aug., 2013.

KARAGIANNIS, G. S.; WEILE, J.; BADER, G. D.; MINTA, J. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of oxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 13, n. 4, Jan., 2013.

KIM N. S.; KANG, Y. J.; JO, J. O.; KIM, H. Y.; OH, Y. R.; KIM, Y. O.; JUNG, M. H.; OCK, M. S.; CHA, H. J. Elevated Expression of Thymosin β 4, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), and Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α in Early-Stage Cervical Cancers. **Pathology Oncology Research**, Budapest, v. 17, n. 3, p. 493-502, Sep., 2011.

LANDONI, F.; MANEO, A.; COLOMBO, A.; PLACA, F.; MILANI, R.; PEREGO, P.; FAVINI, G.; FERRI, L.; MANGIONI, C. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. **Lancet**, London, v. 350, n.9077, p. 535-540, Aug., 1997.

LARA-PEZZI, E.; GÓMEZ-GAVIRO, M. V.; GÁLVEZ, B. G.; MIRA, E.; IÑIGUEZ, M. A.; FRESNO, M.; MATÍNEZ-A, C.; ARROYO, A. G.; LÓPEZ-CABRERA, M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 12, p. 1831-1838, Dec., 2002.

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

LIU, M. Z.; XIE, D.; MAI, S. J.; TONG, Z. T.; SHAO, J. Y.; FU, Y. S.; XIA, W. J.; KUNG, H. F.; GUAN, X. Y.; ZENG, Y. X. Overexpression of AIB1 in Nasopharyngeal Carcinomas Correlates Closely With Advanced Tumor Stage. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 129, n. 5, p. 728-734, May, 2008.

LO, WAN-YU ; WANG, HUANG-JOE ; CHIU, CHIH-WEI ; CHEN, SUNG-FANG. miR-27b-regulated TCTP as a novel plasma biomarker for oral cancer: From quantitative proteomics to post-transcriptional study. **Journal of Proteomics**, Netherlands, v. 77, p. 154-166, Aug., 2012.

LÓPEZ, J.; POITEVIN, A.; MENDOZA-MARTINEZ, V.; PÉREZ-PLASENCIA, C.; GARCIA-CARRANCA, A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. **BMC Cancer**, London, v. 12, p. 48, Jan., 2012.

LUO, K. J.; WEN, J.; XIE, X.; FU, J. H.; LUO, R.Z.; WU, Q. L.; HU, Y. Prognostic relevance of Id-1 expression in patients with resectable esophageal squamous cell

carcinoma. **The Annals of Thoracic Surgery**, Boston, v. 93, n. 5, p. 1682-1688, May, 2012.

MA, YU-PING; ZHU, WU-LING. Cytoplasmic and Nuclear Localization of TCTP in Normal and Cancer Cells. **Biochemistry Research International**, New York, v.2012, May 2012.

MABJEESH, N. J.; ESCUIN, D.; LAVALLEE, T. M.; PRIBLUDA, V. S.; SWARTZ, G. M.; JOHNSON, M. S.; WILLARD, M.T.; ZHONG, H.; SIMONS, J. W.; GIANNAKAKOU, P. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 363-375, Apr., 2003.

MARTINS-GREEN, M. ; VOUDREAU, N. ; BISSELL, M. J. Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n. 16, p. 4334-4341, Aug., 1994.

MO, W.; ZHANG, J.; LI, X.; MENG, D.; GAO, Y.; YANG, S.; WAN, X.; ZHOU, C.; GUO, F.; HUANG, Y.; AMENTE, S.; AVVEDIMENTO, E. V.; XIE, Y.; LI, Y. Identification of Novel AR-Targeted MicroRNAs Mediating Androgen Signalling through Critical Pathways to Regulate Cell Viability in Prostate Cancer. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, e56592, Feb., 2013.

MORIMOTO, S.; NISHIMURA, N.; TERAJ, T.; MANABE, S.; YAMAMOTO, Y.; SHINAHARA, W.; MIYAKE, H.; TASHIRO, S.; SHIMADA, M.; SASAKI, T. Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of occludin to the cell surface. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 3, p. 2220-2228, Jan., 2005.

MÜNGER, K.; PHELPS, W. C.; BUBB, V.; HOWLEY, P. M.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 Genes of the Human Papillomavirus Type 16 Together Are Necessary and Sufficient for Transformation of Primary Human Keratinocytes. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 63, n. 10, p. 4417-4421, Oct., 1989.

NAGANO-ITO, MICHIO; ICHIKAWA, SHINICHI. Biological Effects of Mammalian Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) on Cell Death, Proliferation, and Tumorigenesis. **Biochemistry Research International**, New York, v. 2012, Mar., 2012.

NARISAWA-SAITO, M. ; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, Tokyo, v. 98, n. 10, p. 1505-1511, Oct., 2007.

NOKES, R. L.; FIELDS, I. C.; COLLINS, R. N.; FÖLSCH, H. Rab13 regulates membrane trafficking between TGN and recycling endosomes in polarized epithelial cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 182, n. 5, p.845-853, Sep., 2008.

OLIANI, S. M. ; DAMAZO, A. S. ; PERRETTI, M. Annexin 1 localization in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, v. 11, n. 5, p. 287-292, Oct., 2002.

- OLIANI, S. M. ; PERRETTI, M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, Firenze, v. 106, n. 2, p. 69-77, 2001. Supplement 1.
- OLIANI, S. M.; CIOCCA G. A.; PIMENTEL, T. A.; DAMAZO, A. S.; GIBBS, L.; PERRETTI, M. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel, v. 57, n. 10, p. 450-456, Oct., 2008.
- OLIANI, S. M.; PAUL-CLARK, M. J.; CHRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed post-capillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 158, p. 603-615, Feb., 2001.
- ONGENAERT, M.; WISMAN, G. B.; VOLDERS, H. H.; KONING, A. J.; ZEE, A. G.; VAN CRIEKINGE, W.; SCHUURING, E. Discovery of DNA methylation markers in cervical cancer using relaxation ranking. **BMC Medical Genomics**, London, v. 24, p. 1-57, Nov., 2008.
- PECTASIDES, D.; KAMPOSORAS, K.; PAPAXOINIS, G.; PECTASIDES, E. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. **Cancer Treatment Review**, London, v. 34, n. 7, p. 603-613, Nov., 2008.
- PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leucocyte-endothelium interaction. **Trends Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 18, p. 418-425, Nov., 1997.
- PERRETTI, M. ; GAVINS, F. N. 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**, Bethesda, v. 18, p. 60-64, Apr., 2003.
- PERRETTI, M.; GETTING, S. J.; SOLITO, E.; MURPHY, P. M.; GAO, J. L. Involvement of the receptor for formylated peptides in the *in vivo* anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. **The American Journal of Pathology, Bethesda**, v. 158, n. 6, p. 1969-1973, Jun., 2001.
- RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler Rapid Cycle Real-Time PCR. **Methodos and Applications**. Springer Press, Heidelberg, p. 21-34, 2001.
- RAYNAL, P. ; POLLARD, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1197, p. 63-93, Apr., 1994.
- RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of Cell Science**, London, v. 117, n. 13, p. 2631-2639, Jun., 2004.
- ROBBINS E COTRAN. Bases patológicas das doenças / Vinay Kumar et al; [tradução de Patrícia Dias Fernandes et al]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

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

RODRIGUES-LISONI, F. C.; MEHET, D. K.; PEITL, P. JR.; JOHN, C. D.; DA SILVA JUNIOR, W. A.; TAJARA, E.; BUCKINGHAM, J.C.; SOLITO, E. *In vitro* and *in vivo* studies on CCR10 regulation by Annexin A1. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, n. 5, p. 1431-1438, Feb., 2006.

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

ROSZAK, A.; LIANERI, M.; SOWINSKA, A.; JAGODZINSKI, P. P. Involvement of toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. **Molecular Biology Reports**, Netherlands, v. 39, n. 8, p. 8425-8430, Aug., 2012.

SAKAGUCHI, H.; FUJIMOTO, J.; SUN, W. S.; TAMAYA, T. Clinical implications of steroid receptor coactivator (SRC)-3 in uterine endometrial cancers. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 104, n. 3-5, p. 237-240, May, 2007.

SALGADO, R.; BENOY, I.; VERMEULEN, P.; VAN DAM, P.; VAN MARCK, E.; DIRIX, L. Circulating basic fibroblast growth factor is partly derived from the tumour in patients with colon, cervical and ovarian cancer. **Angiogenesis**, London, v. 7, n. 1, p. 29-32, Jan., 2004.

SAMBROOK, J. ; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3th. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SHEN, L.; LAN, Z.; SUN, X.; SHI, L.; LIU, Q.; NI, J. Proteomic analysis of lanthanum citrate-induced apoptosis in human cervical carcinoma SiHa cells. **Biometals**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1179-1189, Dec., 2010.

SILISTINO-SOUZA, R.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; CURY, P. M.; MANIGLIA, J. V.; RAPOSO, L. S.; TAJARA, E. H.; CHRISTIAN, H. C.; OLIANI, S. M. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **International Journal of Cancer**, New York, v. 120, n. 12, p. 2582-2589, Jun., 2007.

SOTO-DE LEON, S.; CAMARGO, M.; SANCHEZ, R.; MUNOZ, M.; PEREZ-PRADOS, A.; PURROY, A.; PATARROYO, M. E.; PATARROYO, M. A. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e14705, Feb., 2011.

TLSTY, T. D.; HEIN, P. W. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 11, n. 1, p. 54-59, Feb., 2001.

TUYNDER, M.; SUSINI, L.; PRIEUR, S.; BESSE, S.; FIUCCI, G.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Biological models and genes of tumor reversion: Cellular

reprogramming through *tpt1/TCTP* and *SIAH-1*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 23, p. 14976-14981, Oct., 2002.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, London, v. 189, n. 1, p. 12-19, Sep., 1999.

WEI, H.; LI, F.; FU, P.; LIU, X. Effects of the silencing of hypoxia-inducible factor-1 alpha on metastasis of pancreatic cancer. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 436-446, 2013.

XU, A.; BELLAMY, A.R.; TAYLOR, J.A. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. **Biochem Journal**, London, v. 342, n.3, p. 683-689, Sep., 1999.

YAO, FENG; ZHAO, TIEJUN; ZHONG, CHENXI; ZHU, JI; ZHAO, HENG. LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. **Tumour Biology**, Netherlands, v. 34, n. 1, 2013.

YEE, C.; KRISHNAN-HEWLETT, I.; BAKER, C. C.; SCHLEGEL, R.; HOWLEY, P. M. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 119, n. 3, p. 361-366, Jun., 1985.

YEW, C. W.; LEE, P.; CHAN, W. K.; LIM, V. K.; TAY, S. K.; TAN, T. M.; DENG, L. W. A novel MLL5 isoform that is essential to activate E6 and E7 transcription in HPV16/18-associated cervical cancers. **Cancer Research**, Baltimore, v. 71, n. 21, p. 6696-6707, Sep., 2011.

YI, B.; ZENG, J.; WANG, G.; QIAN, G.; LU, K. Annexin A1 protein regulates the expression of PMVEC cytoskeletal proteins in CBDL rat serum-induced pulmonary microvascular remodeling. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 11, n. 98, Apr., 2013.

ZHANG, Y.; CHEN, F.Q.; SUN, Y. H.; ZHOU, S. Y.; LI, T. Y.; CHEN, R. Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 30, p. 98, Oct., 2011.

ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; WANG, S. Z.; WANG, N.; JIANG, W. G.; JI, Y. H.; ZHANG, S. L. Reduced expression of tissue factor pathway inhibitor-2 contributes to apoptosis and angiogenesis in cervical cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 31, n. 1, p. 1-9, Jan, 2012.

ZHENG, Y.; CHEN, H.; ZENG, X.; LIU, Z.; XIAO, X.; ZHU, Y.; GU, D.; MEI, L. Surface modification of TPGS-b-(PCL-ran-PGA) nanoparticles with polyethyleneimine as a co-delivery system of TRAIL and endostatin for cervical cancer gene therapy. **Nanoscale Research Letters**, New York, v. 8, n. 1, p.161, Apr., 2013.

ZHU, WU-LING; CHENG, HAI-XIA; HAN, N.; LIU, DONG-LIANG; ZHU, WEN-XIAO; FAN, BING-LIN; DUAN, FANG-LING. Messenger RNA Expression of Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) in Liver Regeneration and Cancer. **Anticancer Research**, v. 28, n. 3A, p. 1575-1580, May-Jun., 2008.

ZIJLMANS, H. J.; FLEUREN, G. J.; HAZELBAG, S.; SIER, C. F.; DREEF, E. J.; KENTER, G. G.; GORTER, A. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer. **British Journal of Cancer**, London. v. 100, n. 10, p. 1617-1626, Apr., 2009.

Tabela A: Descrição dos genes encontrados pela técnica de RaSH, SUB I. Informações referentes a funções e processos de que participam.

Nome do gene	NM	Símbolo	Localização cromossômica	Funções	Processos
ACSL3 acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	NM_004457.3	ACSL3	2q34-q35	Ligante ATP; Atividades ligase da cadeia longa do ácido graxo CoA;Ligante do domínio específico de proteína; Ligante proteína kinase	Desenvolvimento do cérebro; Processo metabólico lipídico celular; Processo biossintético do ácido graxo; Importação de ácidos graxos de cadeia longa; Regulação positiva do transporte de proteínas do golgi para membrana plasmática; Regulação positiva do processo biossintético fosfadilcolina; Regulação positiva de secreção; Resposta a nutriente
Ribosomal protein L9	NM_000661.4	RPL9	4p13	Ligante de RNA; Ligante de rRNA; Constituinte estrutural do ribossomo	Processo metabólico RNA; Processo metabólico de proteína celular; Expressão gênica; Processo metabólico do mRNA;Tradução;Ciclo de infecção viral; Reprodução e transcrição viral
RAB13, member RAS oncogene family	NM_002870.2	RAB13	1q21.2	Ligante GTP; Atividade GTPase	Processo catabólico GTP; Adesão celular; Tradução de sinal mediada por pequena GTPase; Transporte mediado por vesícula; Replicação DNA; Checkpoint de replicação de DNA;Iniciação da replicação do DNA;Cadeia de alongação do DNA envolvidos na replicação do DNA;Transição G1/S do ciclo celular mitótico; Transição M/G1 do ciclo celular mitótico;Fase S do ciclo celular mitótico; Checkpoint do ciclo celular
PHACTR2 phosphatase and actin regulator 2	NM_001100164.1	PHACTR2	6q24.2	Ligante de actina; Ligante de proteína; Atividade inibidora da proteína fosfatase	Sem processos
Vacuole membrane	NM_030938.3	VMP1	17q23.1	Ligante de proteína	Autofagia; Montagem de junção

protein 1					celular; Adesão célula célula; Implantação do embrião; Regulação da autofagia
Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	NM_206917.1	NGFRAP1	Xq22.2	Atividade ativadora da endopeptidase tipo cisteína envolvido no processo apoptótico; Ligante do receptor de morte; Ligante de íon metal; Ligante de proteína	Ativação da atividade endopeptidase tipo cisteína envolvida no processo apoptótico; Processo apoptótico; via extrínseca de sinalização apoptótica através de receptores de domínio de morte; desenvolvimento do organismo multicelular; via de sinalização do fator de crescimento do nervo
Brain expressed, X-linked 5	NM_001012978.2	BEX5	Xq22.1	Sem função	Sem processos
Tumor protein, translationally controlled	NM_003295.2	TPT1	13q14	Ligante íon cálcio; Ligante do fator de transcrição	Transporte íon cálcio; Homeostase do íon cálcio celular; Regulação negativa do processo apoptótico; Resposta à vírus
TPT1-like protein	NM_207422.2	FLJ44635	Xq13.1	Sem função	Sem processos
Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_005063.4	SCD	10q24.31	Ligante íon ferro; Atividade stearyl-CoA9-desaturase	Processo biossintético de ácido graxo
Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	NM_006283.2	TACC1	8p11.22	Ligante de proteína; Ligante do domínio específico de proteína	Ciclo celular; Divisão celular; Desenvolvimento do córtex cerebral; Migração intercinética nuclear; Organização do microtúbulo do citoesqueleto; Neurogeneses; Regulação do processo baseado no microtúbulo
Poly (ADP-ribose) polymerase 2	NM_005484.3	PARP2	14q11.2-q12	Ligante de DNA; Atividade ribosiltransferase NAD+ADP	Reparo DNA; Reparo de excisão de base; Ribosilação ADP de proteína
Solute carrier family 18, subfamily B, member 1	NM_052831.2	SLC18B1	6q22.3-q23.3	Transporte transmembrana	Integração a membrana
Eukaryotic translation	NM_005801.3	EIF1	17q21.2	Atividade do fator de tradução, ligante de ácido nucleico;	Regulação da iniciação da tradução; Resposta ao estresse

initiation factor 1				Atividade do fator de iniciação da tradução	
Calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	NM_001743.4	CALM2	2p21	Sem função	Sem processo
Transmembrane BAX inhibitor motif containing 6	NM_005566.3	LDHA	11p15.4	Atividade lactato-desidrogenase; Ligante de nucleotídeo; Interação com HIV	Processo metabólico do carboidrato celular; Resposta celular ao estímulo extracelular; Glicólise; Processo metabólico do piruvato;
Cold shock domain containing E1, RNA-binding	NM_001007553.2	CSDE1	1p22	Ligante de DNA; Ligante de RNA	Desenvolvimento da gônada masculina; Regulação da transcrição, DNA-dependente
Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	NM_001017963.2	HSP90AA1	14q32.33	Ligante ATP; Atividade ATPase; Ligante domínio TPR; Ligante de proteína idêntica; Atividade regulatória da síntese de óxido nítrico; Ligante de proteína; Ligante de nucleotídeo; Atividade de homodimerização de proteína	Processo catabólico ATP; Transição G2/M do ciclo celular mitótico; Montagem complexa da proteína chaperona mediada; Transporte mitocondrial; Ciclo celular mitótico; Processo metabólico do óxido nítrico; Regulação positiva da biossíntese do óxido nítrico; Importação da proteína pela membrana mitocondrial externa; Transdução de sinal
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	NM_030755.4	TMX1	14q22.1	Atividade redutase do arseniato (tioredoxina); Atividade oxirredutase dissulfido	Replicação DNA; Transporte vesícula-mediada do ER para golgi; Proliferação celular; Homeostase celular redox; Cadeia de transporte de elétron; Ativação de leucócito; Regulação negativa do processo apoptótico; Regulação positiva da transcrição DNA-dependente; Transdução de sinal
Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-	NM_002165.3	ID1	20q11	Ligante de proteína; Atividade de dimerização de proteína; Atividade do fator de transcrição ligante DNA sequência	Via de sinalização BMP; Angiogênese; Processo apoptótico; Morfogênese do vaso sanguíneo; Processo metabólico do colágeno;

helix protein				específica	Morfogênese endotelial celular; Morfogênese do pulmão; Desenvolvimento da vasculatura do pulmão; Regulação negativa do ligante de DNA; Regulação negativa da diferenciação do osteoblasto; Regulação negativa da transcrição pela localização do fator de transcrição; desestabilização proteica; regulação da cascata MAPK; regulação da angiogênese; resposta a antibiótico; transcrição DNA dependente; transformação da via de sinalização do receptor do fator de crescimento beta
Heat shock protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	NM_005347.4	HSPA5	9q33.3	Ligante ATP; Atividade ATPase Ligante íon cálcio; Ligante chaperona; Ligante proteína; Ligante do domínio específico de proteína; Ligante ribossômico; Ligante proteína ubiquitina ligase	Processo catabólico ATP; Resposta a sobrecarga ER; Processo catabólico de proteína associado a ER; Coagulação sanguínea; Resposta celular a inanição de glicose; Desenvolvimento da camada celular cerebelar de Purkinje; Organização estrutural cerebelar; Resposta a proteína desdobrada do retículo endoplasmático;Regulação negativa do processo apoptótico; Ativação plaquetária; Regulação positiva da ubiquitinação de proteína regulação do enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático

Tabela B: Descrição dos genes encontrados pela técnica de RaSH, SUB II. Informações referentes a funções e processos de que participam.

Nome do gene	NM	Símbolo	Localização cromossômica	Funções	Processos
Cathepsin A	NM_000308.2	CTSA	20q13.1	atividade carboxipeptidase; atividade ativador enzimático; atividade carboxypeptidase tipo serina	processo metabólico glicosfingolípido; transporte intracelular de proteínas; processo metabólico fosfolípido; regulação positiva da atividade catalítica; proteólise; processo metabólico de molécula pequena; processo metabólico esfingolípido
Signal peptide peptidase like 3	NM_139015.4	SPPL3	12q24.31	Atividade aspártico endopeptidase, clivagem intramembrana; Atividade dehomodimerização de proteína	NOT membrane protein ectodomain proteolysis
IQ motif containing GTPase activating protein 1	NM_003870.3	IQGAP1	15q26.1	Atividade ativadora de GTPase; Inibidor da atividade GTPase; Rac GTPase de ligação; Ras GTPase atividade ativadora; ligante de íon cálcio; ligante da proteína cinase; ligante da proteína fosfatase	Resposta celular ao íon cálcio; Processo metabólico de energia reserva; Desenvolvimento celular do epitélio glomerular visceral; Regulação negativa da desfosforilação; regulação positiva da atividade GTPase; regulação positiva da actividade da proteína cinase; regulação da produção de citocinas; regulação da secreção de insulina; transdução de sinal
Pyruvate kinase, liver and RBC	NM_000298.5	PKLR	1q21	Ligante de ATP; Ligante ion magnésio; ligante de íons de potássio; atividade da cinase piruvato	Processo de biossíntese de ATP; Processo metabólico de carboidratos; Resposta celular ao estímulo de insulina; Desenvolvimento endócrino do pâncreas; Processo metabólico de energia reserva; Metabolismo da

					glicose;Glicólise Redução positiva do processo metabólico celular; Processo biossíntese do piruvato; Resposta ao ATP; Resposta ao cAMP; Resposta a hipóxia
Pyruvate kinase, muscle	NM_002654.4	PKM	15q22	Ligante de ATP; Ligante ion magnésio; ligante de íons de potássio; ligante de proteínas; actividade da cinase piruvato	processo metabólico de carboidratos; metabolismo da glicose; glicólise; morte celular programada;
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A	NM_003750.2	EIF3A	10q26	Ligante de proteína; Atividade estrutural da molécula; Contribui para a atividade de tradução do fator de iniciação	Processo metabólicocelular de proteínas; Formação do complexo de iniciação de tradução; Tradução
Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	NM_003791.2	MBTPS1	16q24	atividade endopeptidase do tipo serina	Processo metabólico do colesterol; Metabolismo lipídico; Proteólise; Regulação do fator de transcrição de importação para o núcleo
Secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_003064.2	SLPI	20q12	atividade do inibidor de endopeptidase; ligante de proteína; ligante de enzima; inibidor da atividade endopeptidase tipo serina	regulação negativa da atividade endopeptidase; regulação negativa de ligação às proteínas; regulação negativa da replicação do genoma viral
Heat shock 70kDa protein 1A	NM_005345.5	HSPA1A	6p21.3	Sem função	Sem processos
Heat shock 70kDa protein 1B	NM_005346.4	HSPA1B	6p21.3	Ligante de ATP; Ligante N-terminal de proteína; Ligante de proteína; Ligante da roteína	Processo metabólico do RNA; Expressão gênica; Processo catabólico mRNA; Processo metabólico mRNA;

				ligase ubiquitina	Regulação negativa do processo apoptótico; Regulação negativa do crescimento e proliferação celular
Heat shock 70kDa protein 2	NM_021979.3	HSPA2	14q24.1	Ligante de ATP; Ligante glicolipídico; Ligante de proteína	Meiose masculina; Regulação positiva da proteína dependente de ciclina/treonina; Atividade kinase envolvida na G2/M; Desenvolvimento de espermátide
Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	NM_005347.4	HSPA5	9q33.3	Ligante ATP; Atividade ATPase; Ligante íon calico; Ligante chaperona; Ligante de proteína; Ligante domínio específico de proteína; Ligante ribossômico; Ligante proteína ligase ubiquitina	Processo catabólico ATP; Resposta à sobregarga do ER; Processo proteico catabólico associado ER; Coagulação sanguínea; Resposta celular à inanição de glicose; Desenvolvimentoda camada celular de Purkinje; Organização estrutural do cerebelo; Regulação negativa do processo apoptótico
Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B)	NM_002155.3	HSPA6	1q23	Ligante de ATP	Resposta a proteína desdobrada
Heat shock 70kDa protein 8	NM_006597.4	HSPA8	11q24.1	Ligante ATP; Atividade ATPase acoplada; Ligante de proteína	Processo metabólico RNA; Splicing RNA; Organização da membrana celular; Expressão gênica; Processo metabólico mRNA; ;Regulação negativa da transcrição, DNA dependente; Secreção de neurotransmissor; Transporte vesícula de golgi; Regulação do ciclo celular; Interação vírus-hospedeiro
Ribosomal protein L6	NM_001024662.1	RPL6	12q24.1	Ligante de RNA; Ligante de DNA; Constituinte	Processo metabólico RNA; Processo metabólico

				estrutural do ribossomo	de proteína celular; Expressão gênica; Processo metabólico mRNA; Regulação da transcrição, DNA dependente; Iniciação, alongação e terminação da tradução; Reprodução, transcrição viral
LIM domain and actin binding 1	NM_006435.2	IFITM2	11p15.5	Sem função	Via de sinalização mediada-citocina; Resposta de defesa a vírus; Resposta imune; Resposta negativa da entrada viral na célula hospedeira; Resposta a interferons alfa, beta e gama
Interferon induced transmembrane protein 3	NM_021034.2	IFITM3	11p15.5	Sem função	Via de sinalização mediada-citocina; Resposta de defesa a vírus; Resposta imune; Resposta negativa da entrada viral na célula hospedeira; Resposta negativa da replicação do genoma viral; Resposta a interferons alfa, beta e gama
Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	NM_001039590.2	USP9X	Xp11.4	Ligante co-SMAD; atividade endopeptidase tipo cisteína; atividade peptidase-tipo cisteína; ligante de proteína; atividade tiolesterase ubiquitina	Via de sinalização BMP; Divisão celular; Segregação cromossômica; Geração de gameta feminino; Expressão gênica; Mitose; Regulação negativa da transcrição a partir do promotor Polimerase II; desubiquitinação de proteína; transcrição DNA dependente;
Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked	NM_004654.3	USP9Y	Yq11.2	Ligante co-SMAD; atividade peptidase-tipo cisteína; atividade tiolesterase	Via de sinalização BMP; desubiquitinação de proteína; espermatogênese; transformador da via de sinalização do fator

				ubiquitina; atividade protease ubiquitina específica	de crescimento beta; processo catabólico de proteína dependente de ubiquitinação
Prosoposin	NM_002778.2	PSAP	10q21-q22	Atividade do ativador enzimático; Ligante lipidico	Coagulação sanguínea; Resposta celular a substância orgânica; Diferenciação celular epitelial envolvida no desenvolvimento da glândula prostática; Processo metabólico glicosésfingolipídica;Tr ansporte lipídico; Regulação positiva da atividade catalítica; Regulação da cascata MAPK
Chromosome 21 open reading frame 33	NM_004649.6	C21orf33	21q22.3	Sem função	Sem processo
Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	NM_006904.6	PRKDC	8q11	Ligante ATP; Ligante DNA; Atividade da proteína kinase dependente DNA; Ligante de enzima; Ligante de proteína; Ligante fator de transcrição	Reparo DNA; Diferenciação células T no timo; Processo apoptótico; Desenvolvimento do cérebro; Processo de modificação de proteína celular; Resposta celular ao estímulo de insulina; Reparo de quebra da cadeia dupla; Morte celular programada de célula germinativa; Desenvolvimento do coração; Manutenção do telômero
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	NM_001356.3	DDX3X	Xp11.3-p11.23	Ligante ATP; Atividade DNA helicase ATP- dependente; Atividade RNA helicase ATP- dependente; Atividade ATPase; Ligante DNA; Ligante RNA; Ligante do fator de iniciação	processo catabólico do ATP; resposta celular ao estresse osmótico; segregação cromossômica; resposta imune inata;cascata proteína kinase intracelular; via de sinalização apoptótica intrínseca; montagem do ribossomo maduro;

				eucariótico 4E; Ligante 5'UTR mRNA; Ligante RNA poli A;Ligante de proteína; Ligante da subunidade menor ribossômica; Ligante do fator de transcrição Ligante do fator de iniciação da tradução	; regulação negativa do processo apoptótico; regulação negativa do crescimento celular; regulação negativa da tradução; regulação positiva da transição G1/S do ciclo mitótico; regulação positiva do processo apoptótico; regulação positiva do crescimento celular
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	NM_001122665.1	DDX3Y	Yq11	Ligante ATP Atividade helicase ATP-dependente Ligante DNA Ligante RNA	Sem processos
ADP-ribosylation factor interacting protein 2	NM_003791.2	MBTPS1	16q24	Atividade endopeptidase tipo serina	Processo metabólico do colesterol; Resposta da proteína desdobrada no retículo plasmático; Processo metabólico de lipídeo; Proteólises
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	NM_003752.3	EIF3C	16p11.2	Ligante de proteína; Contribui para a atividade do fator de iniciação de tradução	Expressão gênica; Tradução; Iniciação da tradução
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C-like	NM_001099661.1	EIF3CL	16p11.2	Sem função	Sem processos
Nuclear receptor coactivator 3	NM_181659.2	NCOA3	20q12	Ligante do receptor androgênico; Ligante cromatina; Atividade acetiltransferase da histone; Ligante de receptor nuclear	Via de sinalização do receptor androgênico; Processo metabólico lipídico celular; Acetilação de histona; Regulação positiva da expressão gênica; Regulação positiva da transcrição a partir do promotor da RNA

				de hormônio; Ligante N-terminal de proteína; Ligante de proteína;	polimerase II; Desenvolvimento da vagina
SRSF protein kinase 1	NM_003137.4	SRPK1	6p21.31	Ligante ATP; Ligante íon magnésio; Ligante de proteína; Atividade proteína kinase; Atividade proteína serina/treonina kinase	Splicing RNA; Segregação cromossômica; Resposta imune inata; Cascata intracelular proteína kinase; Processamento mRNA; Regulação negativa e positiva da replicação do genoma viral; Fosforilação de proteína; Interação vírus-hospedeiro
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	NM_001530.3	HIF1A	14q23.2	Ligante de proteína Hsp90; Ligante de enzima; Ligante de histone acetiltransferase; Ligante histone desacetilase; Ligante de proteína; Proteína ligante da atividade do fator de transcrição	Via de sinalização Nocth; Angiogênese; Transporte axônico de mitocôndria; Resposta celular a hipóxia; Resposta celular a interleucina 1; Resposta celular ao estresse; Homeostase da glicose

Annexin A1 reduces *ID1* expression in cervical carcinoma culture

Janesly Prates¹, Gabriela Bueno Franco¹, Anemari Ramos Dinarte dos Santos², Wilson Araújo da Silva Junior², Bianca Rodrigues da Cunha³, Eloiza Helena Tajara da Silva³, Sonia Maria Oliani¹, Flávia Cristina Rodrigues-Lisoni⁴

¹Department of Biology, Institute of Biosciences, Letters and Science - IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

²Department of Clinical Medical, Foundation Blood Center of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo - FCFRP/USP, Ribeirão Preto, SP.

³Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine of São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto, SP.

⁴Department of Biology and Animal Science, Faculty of Engineering of Ilha Solteira - FEIS/UNESP, Ilha Solteira, SP.

Key words: cervical cancer, cervix, annexin A1, differential gene expression, cell culture, subtractive hybridization, inflammation.

Corresponding author: Flávia Cristina Rodrigues-Lisoni, Department of Biology and Animal Science, Faculty of Engineering of Ilha Solteira - FEIS/UNESP, Av. Brasil, 56. CEP: 15385-000, Ilha Solteira, São Paulo, Brazil.

E-mail: flavialisoni@hotmail.com ; lisoni@bio.feis.unesp.br

Tel: 55 (18)3743 1934 - Fax:55 (18) 3743 1186

Abstract

Background: The cervical cancer is the second type of more frequent cancer in women world-wide, being the fourth cause of death for cancer in developing countries. Cervical carcinogenesis is related with genetic alterations, infection for Human PapillomaVirus (HPV), angiogenesis and inflammatory processes. The idea of that the inflammation is involved in tumorigenesis is supported by the comment of that the cancer appears frequently in areas of chronic inflammation. On the other hand, the inflammatory reply is controlled by the action of anti-inflammatory mediators, who act to keep the homeostasis of the immunological reply to prevent the tecidual injury. Among these mediators we detach the annexin A1 (ANXA1), protein of 37 kDa, that is express for the tumoral cells and acts as modulating of the inflammatory process.

Methods: The SiHa cells were cultured in complete medium (MEM 10%), and treated with annexin A1 (10 µg/mL) to evaluate the possible effects of this protein in 2, 4, 24, 48 and 72 hours. After statistical analysis of the test cell proliferation, we cultivated the cells again for RNA extraction and realization of the Rapid Subtractive Hybridization technique (RaSH). The genes with altered expression, found in RaSH technique, were analyzed by databases Gene Ontology (GO) and Ingenuity Systems©. The validation of

the six differentially expressed genes found was performed by real time quantitative PCR.

Results: The annexin A1 treatment did not change the cell morphology compared with control samples and decreased the growth cell, with results more statistically significant on 72 hours. Therefore, these parameters were chosen to continue with the method. By RaSH was detected change in expression of some genes, including *TPT1*, *LDHA*, *IDI*, *NCOA3*, *HIF1A* and *RAB13*, which are respectively associated with the calcium ion homeostasis, glycolysis, apoptosis, regulation of gene expression and DNA replication. The annexin gene expression decreases *IDI* validated by real-time quantitative PCR.

Conclusions: The data indicate the involvement of the annexin in altered expression of genes involved in tumorigenic processes and show a therapeutic indication for cervical cancer.

Background

Carcinoma of the cervix, also called cervical cancer is the second most frequent neoplasm in women worldwide. Each year approximately 530,000 new cases arise, being the fourth leading cause of death in developing countries, with approximately 275,000 deaths per year (JEMAL et al., 2011).

A directly related to cervical cancer factor is infection with Human Papillomavirus (HPV), about 90% of cases are associated with HPV as a causative agent (JAAFAR et al, 2009; WALBOOMERS et al, 1999). A common feature of this type of tumor is high expression of two oncogenes, *E6* and *E7*, which encode multifunctional proteins known for their ability to inactivate the tumor suppressor, p53 and pRb, respectively (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). This altered expression of oncogenes leads to instabilities in the genome by blocking the cell cycle checkpoints and deregulation of these cells due to loss of these tumor suppressors, then progressing the tumorigenic process (INCASSATI et al., 2006).

Other factors which contribute to the risk of developing cervical cancer have been described, including age; the number of sexual partners, which has been especially associated with coinfection; prolonged use of hormonal contraceptives; a large number of fullterm pregnancies and cigarette smoking (SOTO-DE LEON et al., 2011).

The inflammatory response is controlled by the action of anti-inflammatory mediators, which act to maintain homeostasis of the immune response and prevent tissue damage. Among these mediators include annexin-A1 (ANXA1), a protein of 37 kDa, which is expressed by tumor cells and acts as a modulator of inflammation (FLOWER, 1988; SILISTINO-SOUZA et al., 2007; ALVES et al., 2008).

The Annexins (ANX) are a well-conserved superfamily of structurally related proteins characterized by a C-terminal homologous domain with 4 to 8 repeats of 70-75 aminoacids, responsible for calcium and phospholipid binding properties. Their variable N-terminal region is unique in length and sequence and includes potential sites of phosphorylation, glycosylation and peptidase action (GERKE;MOSS, 2002). Annexins are present in many organisms, from molds, to plants, fungi and mammals. They are preferentially localized in the cytoplasm and associated with the plasma membrane or cytoskeleton, but some including ANXA1 have also been localized outside the plasma membrane (SOLITO; NUTI; PARENTE, 1994; SOLITO et al, 2003). The function of the annexins is far to be clear, they have been involved in signal transduction (ALLDRIDGE et al, 1999; de COUPADE et al, 2000), vesicle transport (DIAKONOVA et al, 1997), cell transformation (VIOLETTE et al, 1990; SOLITO et al, 1998), inflammation (PERRETI, GAVINS, 2003), cell matrix interaction and apoptosis (RAYNAL; POLLARD, 1994; SOLITO et al, 2003).

Annexin A1 (ANXA1), originally known as lipocortin 1, was the first member of this family to be cloned (WALLNER et al, 1986) and mimic the anti-inflammatory activity of glucocorticoids by inhibiting the synthesis of eicosanoids and phospholipase A2 (PLA2) activity, affecting this form components of the inflammatory reaction and release of arachidonic acid (FLOWER, 1988; PERRETTI ; GAVINS, 2003).

The ANXA1 can be especially found in many cell types related to defensive processes as neutrophils (OLIANI et al., 2001), mast cells (OLIANI et al., 2008), eosinophils (OLIANI et al, 2002) and monocytes (GOULDING; GODOLPHIN et al., 1990).

The ANXA1 expression and localization have been investigated in experimental models of acute inflammation induced by carrageenan in the rat mesentery, through the analysis of extravasated leukocytes and vascular endothelium (OLIANI et al, 2001; GIL et al, 2006) and chronic granulomatous inflammation in the skin of mice (GIBBS et al, 2002; OLIANI et al, 2008.).

After discovery by Cirino et al. (1993) that the biological activity of ANXA1 could be reproduced by the first twenty-six amino acids from the N-terminal portion of the protein (peptide Ac2-26), or some smaller peptides (PERRETTI et al. 2001), it became a common practice to use these molecules in experimental models of acute inflammation (DAMAZO et al, 2006; GAVINS et al, 2007), chronic (GIBBS et al, 2002) and systemic (DAMAZO et al, 2005.). The management of these mimetic

peptides of ANXA1 causes the activation of its receptors, which are more abundant in adherent leukocytes and promotes cell activation and intracellular signaling, with the posting of leukocytes to the endothelium (GAVINS et al, 2003; GASTARDELO et al. 2009).

ANXA1 protein expression was significantly increased in high-risk HPV squamous cell carcinoma of penis samples in dependently of the subtype of penile squamous cell carcinoma compared to the HPV negative squamous cell carcinoma of penis samples. Probably ANXA1 might have an oncogenic role in penile cancer with high-risk HPVs (CALMON et al.,2013).

The ANXA1 expression in cervical carcinogenesis has been scarcely investigated. The levels of this protein and its mRNA decreases as the cancer develops, suggesting that ANXA1 may be regarded as a biological marker in tumor progression (LEE et al., 2008). The down-regulation of ANXA1 expression in [LaCit2]3 (Lanthanum citrate complex)-treated SiHa cells suggested that ANXA1 might play a role in the apoptosis via regulating the related growth factors (SHEN et al., 2010).

Thus, the works related to ANXA1 have contributed to a greater understanding of the role of this protein in inflammatory and tumorigenic process. However, the molecular mechanisms by which ANXA1 modulates cellular responses in the inflammatory process are not yet fully determined. Available data suggest that this protein may have, in addition to its important role in the inflammatory process, significant involvement in cancer, through signaling cascades that include genes related to cell cycle, differentiation and apoptosis.

In order to investigate the effect of ANXA1 in cervical cancer, we evaluated the influence of this protein on the morphology, cell proliferation and gene expression, identifying the signaling pathways that genes modulated by ANXA1 participate which are important for tumorigenic and the inflammatory process.

Materials and Methods

SiHa Culture conditions

The SiHa cell line, originally established from an epidermoid carcinoma of the cervix (ATCC, Rockville, Maryland, USA), was seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75cm^2 culture flask (Corning, NY, USA) in medium MEM-Earle (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), pH 7.5, supplemented with 10% fetal calf serum (Cultilab), 1%

non-essential amino acids, 1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), and cultured at 37°C under 5% of atmosphere CO₂.

Pharmacological treatments

The SiHa cells were subdivided into two groups: a) control, without manipulation b) submitted to the addition of peptide Ac2-26 [10µg/mL]. The experiments were conducted during the times of 2, 4, 24, 48 and 72 hours for determining the statistically significant time to continue the methodology.

Growth curve

SiHa cells were seeded at a density of 5×10^4 cells in plastic 6-well plates in triplicates and divided in two groups: (a) growth on complete medium – control and (b) submitted to the addition of peptide Ac2-26. Twenty-four hours later, when cells had already adhered, SiHa cultures were incubated with serum free medium (MEM 0%). After the 24 hours the control group was maintained with complete medium, without any pharmacological manipulation and the other group was submitted to the addition of peptide.

Cell morphology was observed every day. The cytotoxic effect of the annexin with regard to the proliferation of SiHa cells were investigated in two experiment groups at 2, 4, 24, 48 and 72 hours. The cells were harvested and counted using a Neubauer hemocytometer. Statistical differences between groups were determined by one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed, if significant, by the Bonferroni test. The same experiment was repeated twice.

RNA extraction for Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) and real time PCR experiments

The RNA from SiHa cells subjected to experimental conditions (control and annexin A1) was extracted by the method of Trizol.

SiHa cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75cm² culture flasks in complete medium (controls), as described earlier, and incubated with 10µg/mL of peptide Ac2-26, for 72 hours and harvested by addition of TRIZol Reagent, following treatment with DNase (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by the manufacturer.

Rapid Subtraction Hybridization (RaSH)

RaSH technique (JIANG et al., 2000) was performed with two subtraction, one named “Sub I”, the SiHa control cells been *tester* and the cells treated with annexin A1 been *driver*, and in the other one, named “Sub II” the opposite test was performed.

The cell culture was conducted in large culture flaks in two different conditions (control cells, without manipulation and the cells treated with annexin) for RNA extraction with TRIzol (SAMBROOK, RUSSEL, 2001). Aliquots (10 μ g) of total RNA from both groups were used for double-stranded complementary DNA (cDNA) synthesis.

The first cDNA strand was obtained by reverse transcriptase with 2 μ L of oligo (dT) (50 mM), 2 μ L of 10 mM dNTPs, at 65 °C for 5 min, and immediately on ice for 1 min, adding 2.0 μ L of 0.1 mM DTT, 1 μ L of 40 U/ μ L RNAout, 4.0 μ L of 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCL (pH 8,3), 375 mM KCL, 15 mM MgCL₂]. The material was incubated at 42°C for 2 minutes and added 1.0 μ L of SuperscriptTM II reverse transcriptase (RT) (200 U/ μ L). The mixture was incubated again at 42 °C for 50 minutes and then at 70 °C for 15 minutes. The cDNA was used in amplification reactions to segments of β -actin, to verify its quality.

For the synthesis of the second strand of cDNA was used in reactions containing 30 μ L of 5X Second Strand Buffer, 3 μ L of 10 mM dNTPs, 1 μ L of DNA ligase (10 U/ μ L), 4 μ L of DNA Pol I (10 U/ μ L), 1.0 μ L of RNase H (2 U/ μ L) and incubated for 2 hours at 16 °C and after 2 μ L of T4 DNA Pol (5 U/ μ L), continuing the incubation for another 5 minutes. The action of this enzyme was inhibited by the addition of 10 μ L of 0.5 M EDTA. Then, purification was performed with phenol: chloroform and resuspension of the pellet in 45 μ L of water. The cDNA was used in amplification reactions for segments GAPDH, and subsequently digested with 2 μ L of MboI enzyme (10 U/ μ L) and incubated for 1 hour at 37 °C. Then, received over 1 μ L of this enzyme and incubated overnight at 37 °C.

To this cDNA was added 4.1 and 4.5 μ L, respectively, of the adaptors XDPN-14 5'-CTGATCACTCGAGA and XDPN-12 5'-GATCTCTCGAGT (Sigma Chemical, final concentration 10 mM), 8 μ L of 5X T4 DNA ligase buffer Invitrogen©, heated at 55°C for 1 min, and cooled down to 14 °C within 1h. The cDNA received 3 μ L (9 U) of T4 DNA ligase (3U/ μ L), ligation was carried out overnight at 14°C. After phenol/chloroform extraction and ethanol/glycogen precipitation, the mixtures were

diluted to 100µl with TE buffer (10mM Tris/1mM EDTA); 40µl of the mixtures were used for PCR amplification.

The PCR mixtures were set up using 10µM XPDN-18 5'-CTGATCACTCGAGAGATC, 0.4 mM dNTPs, 10 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Thermocycler conditions were one cycle at 72 °C for 5min, followed by 25 cycles of 94°C for 1min, 55°C for 1min, 72°C for 1min, ending in a final extension at 72°C for 3 min. Ten µg of purified PCR product (tester) was digested with 10U/µL XhoI (Invitrogen) for 6 hours at 37 °C and followed phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.

One-hundred nanograms of the tester cDNA were mixed with 5 µg of the driver cDNA in hybridization solution (0.5M NaCl, 50mM Tris/HCl, SDS2% and 40% formamide) and, after heating at 99,9°C for 5 minutes, incubated at 42°C for 1h, and 42°C for 48h. After extraction and precipitation, the hybridization mixture (1µg) was ligated with XhoI-digested pZero plasmid and transformed into competent bacteria. Bacterial colonies were picked and used as DNA template for PCR. Clones were sequenced using an automated DNA sequence and homologies sequences were searched using the BLAST program. Gene ontology (GO) annotation was used for the functional classification of up- and down-regulated genes using terms from Gene Ontology database.

We further analyzed the genes through IPA (Ingenuity Systems©) to relate the differentially expressed genes with biological functions and processes in which these genes are involved and evaluate what the main networks of interaction between them.

Quantitative PCR – RT-qPCR

The SiHa cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL in each 75cm² culture flasks. The culture was performed for the two groups, the manipulation described previously. SiHa cells were cultured for 72 hours and harvested by addition of TRIzol Reagent, following treatment with DNase (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by the manufacturer.

Six differentially expressed genes were selected for validation by quantitative real time PCR experiments according to their direct or indirect involvement in

tumorigenesis. Their expression was checked in treated samples relative to matched non-treated samples.

The primers were manually designed with: 19-23 bp length, 30-80% GC content and a short amplicon size (80-120 bp). Their sequences are available upon request (Table 1). Real time PCR was performed in triplicate using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reaction mixture consisted of a 20ul volume solution containing 100 a 500 ng of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM of each primer and 100 ng cDNA (control and treated with peptide ANXA1Ac2-26 [10 µg/mL]). The PCR conditions were 95°C for 10min followed by 40 cycles of 95° for 15s and 60° for 1min. Melting curve analysis was performed for each gene to check the specificity and identity of the RT-PCR products.

For each primer set, the efficiency of the PCR reaction (linear equation: $y = \text{slope} + \text{intercept}$) was measured in triplicate on serial dilutions of the same cDNA sample. The PCR efficiency (E) was calculated by the formula $E = [10^{(-1/\text{slope})}]$ and ranged from 1.96 to 2.02 in the different assays.

Two control genes (*GAPDH*, *ACTB*) were used as internal standards. The relative expression ratio (fold change) of the target genes was calculated according to Pfaffl (2001). Statistical analysis was performed by a two-tailed unpaired *t* test using GraphPad prism software.

Results

Cellular morphology

Initially SiHa cells were cultured and observed by phase contrast microscopy. These cells have a fusiform appearance and central core, with multiple nucleoli and eucromático position, characterizing a cell of high metabolic activity (Figure 1A). In cells treated with peptide Ac2-26 [10µg/mL], there was no morphological change, and cytoplasmic processes were more clearly observed due to reduced cell proliferation (Figure 1B).

Proliferation Assay

In the proliferation assay, it was possible to observe the growth inhibitory effect by the action of annexin A1, with the one-way ANOVA, using the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software), decreased the proliferation in the cells treated with the annexin when compared with the control group (Figure 2).

Statistical analysis showed that the concentration of 10 µg/mL and the period of 72 hours were the most statistically significant ($P \leq 0,05$).

Genes identified using the RaSH approach

The technology compares two distinct experiments aiming to finding different gene expression. Rapid subtractive hybridization (*RaSH*) performed on SiHa control cells and treated with peptide Ac2-26 for 72 hours brought to the isolation of 82 clones sequenced. By screening these sequences through GenBank (*Blast*) and by rigorous classification and selection, it was identified 55 genes that were differentially expressed. The research acquired two libraries (Sub I and Sub II), 23 genes of the “Sub I” exhibited changes in expression levels in response to control cell and 32 of the “Sub II”, in response to annexin A1 treatment. Therefore, it is expected that the gene expression of one library will be lower than the other one.

In libraries obtained genes with different functions and processes described in the databases of the Gene Ontology (GO), as shown in Tables A and B (Appendix) were found.

We further analyzed the 55 differentially expressed genes through IPA (Ingenuity Systems©). The genes set were especially associated with tumorigenesis, apoptosis, necrosis, cell proliferation and forming a network of important interactions with other genes such as *NF-kB*, *Ubiquitin* and *HSP* (Figure 3) in the “Sub I” and genes that form functional networks associated with cancer, inflammatory diseases, cell cycle, senescence, replication and cell death (Figure 4) in the “Sub II”.

Six differentially expressed genes *TPT1*, *LDHA*, *ID1*, *NCOA3*, *HIF1A* and *RAB13*, which are respectively associated with the calcium ion homeostasis, glycolysis, apoptosis, regulation of gene expression and DNA replication were selected for validation by quantitative real time PCR experiments according to their functions related and according to their direct or indirect involvement in tumorigenic and inflammatory processes.

Real-time PCR validation of differentially expressed genes

For the analysis of RaSH, it is suggested down-regulation of four genes (*ID1*, *LDHA*, *RAB13* and *TPT1*) and up-regulation of two genes (*HIF1A* and *NCOA3*) in SiHa cells treated with the peptide Ac2-26. However, quantitative PCR experiment, only *ID1* gene expression showed a significant reduction in these cells after treatment with the

peptide Ac2-26 (Figure 5). The other genes presented oscillation in gene expression, but not statistically significant, probably because despite the peptide interacts with the cell does not quantitatively modifies the expression of selected genes.

Appendix: See Annex 2 of the dissertation.

Discussion

Although cancer of the cervix can be prevented, it still represents a major public health problem for women, especially in underdeveloped countries where there is little service monitoring and prevention.

The antiinflammatory protein Annexin A1 (ANXA1) would be an indication of treatment, although there is an extensive literature on the pharmacological effects of this protein and its mimetic peptides in inflammatory processes in vitro (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008) and in vivo (GASTARDELO et al, 2009; FACIO et al, 2011), the expression of this protein in cervical carcinogenesis has been scarcely investigated. One study found decreased levels of this protein and it's mRNA in cervical intraepithelial neoplasia, concluding that ANXA1 can be considered a biological marker in the detection of progression of invasive cervical cancer (LEE et al., 2008). In another study, Shen et al (2010) found the low expression of ANXA1 in SiHa cells treated with citrate lanthanun complex, suggesting a role of this protein in the pathway of regulating apoptosis-related growth factors. Thus, we find the action of ANXA1 on SiHa cells (derived from squamous cell carcinoma of the cervix), a cell line that would provide the best conditions for the experiments. These cells containing the HPV16 were estimated about 10 copies of integrated HPV 16 DNA into cellular DNA (YEE et al, 1985).

In this paper, by analyzing SiHa cell line, we observed that the morphology did not change after treatment with peptide Ac2-26, however, cell proliferation decreased after 72 hours of treatment. ANXA1 mediates the disruption of normal cell morphology and inhibits cyclin D1 expression, therefore reducing cell proliferation through proximal modulation of the ERK signal transduction pathway (ALLDRIDGE; BRYANT, 2003). ANXA1 has direct antiproliferative effects on cells possibly via a constitutive overactivation of ERK1/2 and that the antiproliferative role of ANXA1 is, in turn, directly responsible, at least in part, for the growth arrest, suggesting ANXA1 may act as a tumor suppressor (ANG et al.,2009).

After literature analysis, six genes (*HIF1A*, *IDI*, *LDHA*, *NCOA3*, *RAB13* and *TPT1*) show potential involvement in signaling cascades related to tumorigenesis and/or inflammation/tumor cell interactions (angiogenesis, metastasis, lactate dehydrogenase activity, regulation of gene expression, cell adhesion, binding and transport calcium ion) were selected for validation by real-time RT-PCR using treated and non-treated cell lines. For *IDI* gene the results were consistent with the RASH data. For *NCOA3* and *HIF1A* genes the results were not significantly increased expression, they could be considered good molecular markers if they will confirm the high level expression in other cells, while *LDHA*, *RAB13* and *TPT1* genes still require further testing. All These results are probably because the peptide mimetic effects in these cells must be more effective in higher concentrations.

The different expression levels of the gene *IDI* are related to angiogenesis, differentiation and metastasis and its overexpression was detected in esophageal squamous cell carcinoma (LUO et al. 2012), suggesting that in our study, ANXA1 may be regulate this gene by decreasing expression and may be used as a possible therapeutic target. The *IDI* gene is an inhibitor of differentiation or DNA binding that belongs to a family of small molecules of short length (13 to 20 kDa). The differentiation inhibitor containing a helix-loop-helix in which inhibits transcription factors basic DNA binding domain. Thus this gene regulates the transcription factors to target genes (BENEZRA et al., 1990). Infection by high-risk human papillomaviruses (HPVs) is considered to be the central cause of invasive cervical cancer, suggest that high-risk HPVs can enhance the progression of human cervical cancer through *IDI* regulation (DARNEL et al., 2010).

The over-expression of *IDI* alone can induce angiogenic processes of Endothelial progenitor cells (EPCs) in ovarian cancer and *IDI* and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression were increased in EPCs isolated from ovarian cancer patients compared to those obtained from healthy subjects. Concluding that, *IDI* can enhance EPC angiogenesis ovarian cancer, which is mainly mediated by the PI3K/Akt and NF- κ B/MMP-2 signaling pathways (SU et al., 2013).

In most metastatic cancer patients, epithelial tumor cells from primary tumor samples expressed any grade of Id1 positivity. In addition, higher protein expression levels seemed to correlate with a poorer prognosis in prostate cancer (PONZ-SARVISÉ et al, 2013).The overexpression of Id-1 is associated with more aggressive behavior of

tumor cells in human cervical cancer and is an independent marker for tumor progression in this tumor type (SCHINDL et al, 2001).

Studied genes showed differential expression in SiHa cells in a manner dependent on treatment with Ac2-26. In summary, this study highlights the importance of technical RaSH as a fast and efficient method to identify genes modulated by ANXA1 in cells of epithelial origin. Further experiments are needed to determine whether other genes regulated obtained by subtraction and ANXA1 are causally related to treatment-induced changes in this protein. The functions of the genes found we can see that are important in tumor process, amenable to change through interactions in the metabolism of the epithelial cells of the cervix. The cervix is a place of difficult access, the most common being surgery, chemotherapy or radiotherapy practice for the treatment of cervical carcinoma, however new therapeutics are being developed, such as the use of gene therapy associated with nanoparticles tested in HeLa cells (cervical cancer), thus allowing the delivery of drugs into target cells (ZHENG et al., 2013).

Finally, the peptide Ac2-26 alters the proliferation and gene expression in SiHa cell line, and these changes are probably related to inflammatory and tumorigenic processes. Thus, we suggest that the peptide has modulating effects on the metabolism of this cell type. Few investigations have evaluated the effect of this peptide on the expression of selected genes in our work and molecular studies will be necessary to show the mechanisms of action of this anti-inflammatory protein. Thus, our data suggest the importance of future studies with SiHa cells for the development of new therapies, focusing on gene activities that involve the action of ANXA1 and applications of this protein as a possible therapy in cervical carcinoma.

Conclusions

These findings show that the ANXA1 protein alter expression of genes that are involved in signaling cascades of inflammatory and tumorigenic processes, also altering cell proliferation in SiHa cells. Thus, our results point to the applications of the ANXA1 protein as a possible indication of innovative therapies for the treatment of carcinoma of the cervix.

Figures

Table 1. Primers for the interesting genes

Primer	Sequence
HIF1A <i>right</i>	5' TCCTCACACGCAAATAGCTG 3'
HIF1A <i>left</i>	5' TGCTCATCAGTTGCCACTTC 3'
ID1 <i>right</i>	5' TAGTCGATGACGTGCTGGAG 3'
ID1 <i>left</i>	5' AACCGTGCTGCTCTACGACA 3'
LDHA <i>right</i>	5' GCCGTGATAATGACCAGCTT 3'
LDHA <i>left</i>	5' TGGCAGCCTTTTCCTTAGAA 3'
NCOA3 <i>right</i>	5' AAGTCCCCACACCTTCACTG 3'
NCOA3 <i>left</i>	5' TTCTGGCAATACTGGGAACC 3'
RAB13 <i>right</i>	5' CTGCAAAGCGAATGATCAGA 3'
RAB13 <i>left</i>	5' AGCCTACGACCACCTCTTCA 3'
TPT1 <i>right</i>	5' TAGAGCAACCATGCCATCTG 3'
TPT1 <i>left</i>	5' GCTGCAGAACAAATCAAGCA 3'

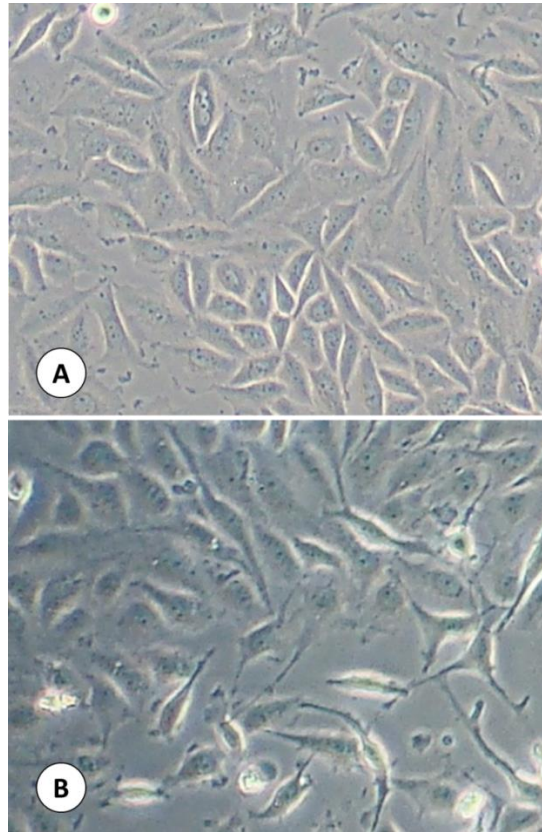


Figure 1: Morphological analysis of cell line SiHa. The cell morphology observed in the control group (A), characterized by a monolayer of nucleated cells was not altered in the group treated with the peptide Ac2-26 [10µg/mL] (B). Hep-2 cells were seeded in complete MEM 10% at a concentration of 5×10^4 per well (6 well plate). 400x magnification

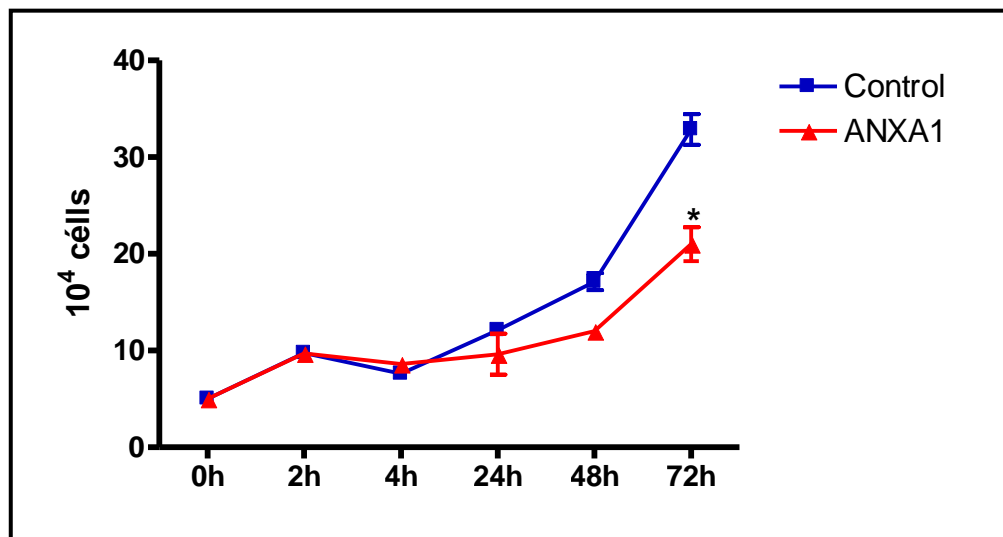


Figure 2: Growth curve of Ac2-26 treatment in SiHa cell line. SiHa cells were cultured in complete medium, treated with Ac2-26 peptide at a concentration of 10µg/mL for 2, 4, 24, 48 and 72 hours. Assays were performed in triplicate. Graph x = time (hours) and y = number of cells $\times 10^4$. *P values ≤ 0.05 were significant.

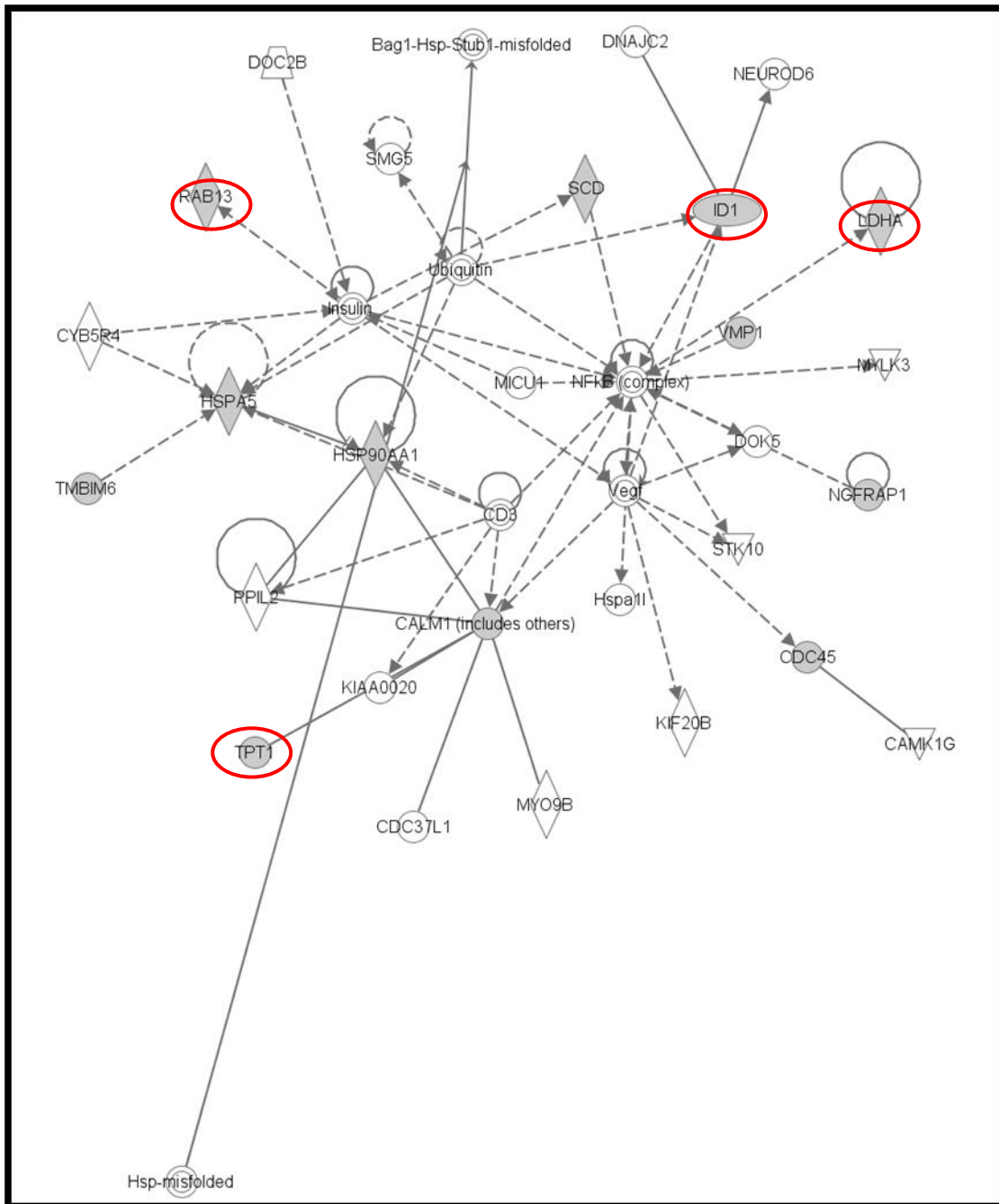


Figure 3: Network of genes from the control SiHa cells subtraction (Sub I). Ingenuity Systems software reveals a network of gene interactions related to tumorigenesis, apoptosis, cell proliferation and necrosis.

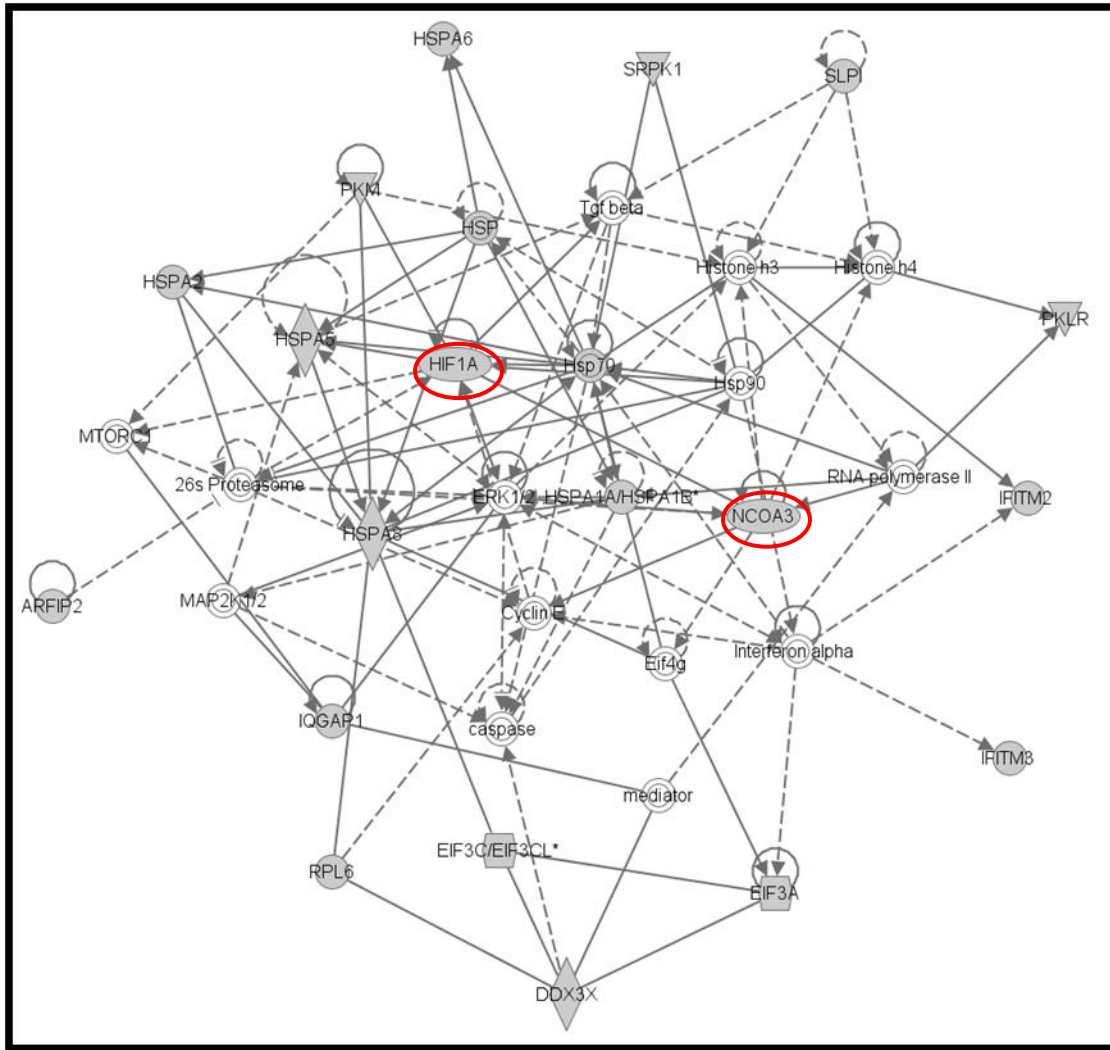


Figure 4: Network of genes from the Ac2-26 treated SiHa cells subtraction (Sub II). Ingenuity Systems software reveals a network of gene interactions associated with cancer, inflammatory diseases, cell cycle, senescence, death and cell replication.

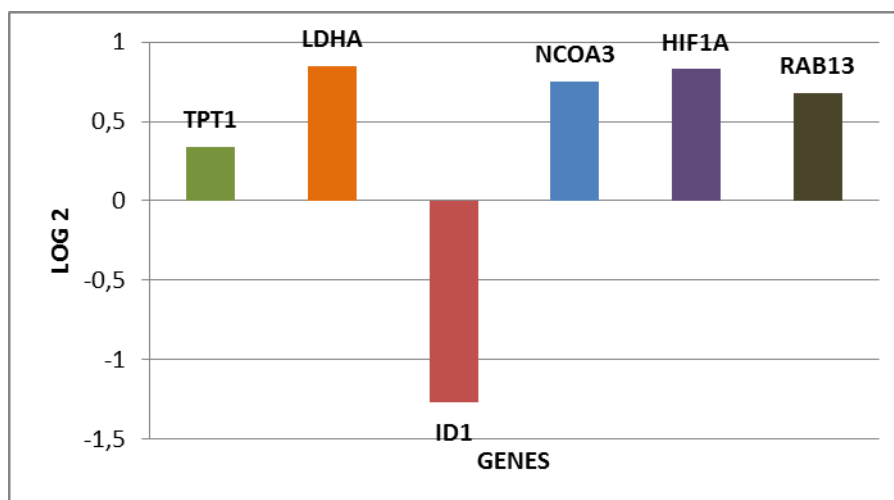


Figure 5: Quantitative real Time PCR gene expression in SiHa cells treated with Ac2-26 peptide. Expression of *HIF1A*, *ID1*, *LDHA*, *NCOA3*, *RAB13* and *TPT1* genes in SiHa cells treated with Ac2-26 peptide (10 μ g/mL), compared with control cells. Assays were performed in triplicate to confirm the results and the data represented in base 2 logarithm.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- ALLDRIDGE, L. C.; BRYANT, C. E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. **Experimental Cell Research**, New York, v. 290, n. 1, p. 93-107, Oct., 2003
- ALLDRIDGE, L. C.; HARRIS, H. J.; PLEVIN, R.; HANNON, R.; BRYANT, C. E. The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 53, p. 37620-37628, Dec., 1999.
- ALVES, V. A. F. NONOGAKI, S.; CURY, P. M.; WÜNSCH-FILHO, V.; DE CARVALHO, M. B.; MICHALUART-JÚNIOR, P.; MOYSES, R. A.; CURIONI, O. A.; FIGUEIREDO, D. L.; SCAPULATEMPONETO, C.; PARRA, E. R.; POLACHINI, G. M.; SILISTINO-SOUZA, R.; OLIANI, S. M.; SILVA-JÚNIOR, W. A.; NOBREGA, F. G.; HEAD AND NECK GENOME PROJECT/GENCAPO; TAJARA, E. H.; ZAGO, M. A. Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology**, Oxford, v. 53, p. 715 - 727, Dec., 2008.
- ANG, E. Z. F.; NGUYEN, H. T.; SIM, H. L.; PUTTI, T.C.; LIM, L.H.K. Annexin-1 Regulates Growth Arrest Induced by High Levels of Estrogen in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 7, n. 2, p. 266-274, Feb., 2009.
- BENEZRA, R.; DAVIS, R. L.; LOCKSHON, D.; TURNER, D. L.; WEINTRAUB, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. **Cell**, v. 61, n. 1, p. 49-59, Apr., 1990.
- CALMON, M. F.; MOTA, M. T.; BABETO, É.; CANDIDO, N. M.; GIROL, A. P.; MENDIBURU, C. F.; BONILHA, J. L.; SILVESTRE, R. V.; ROSA, B. M.; THOMÉ, J. A.; MEDEIROS G. H.; SOARES, F. A.; GUIMARÃES, G. C.; DE ARRUDA, J. G.; OLIANI, S. M.; VILLA, L. L.; VASSALLO, J.; RAHAL, P. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n.1, Jan., 2013.
- CIRINO, G.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; CILIBERTO, G.; ARPAIA, G.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 108, n. 3, p. 573-574, Mar., 1993.
- D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Annexin-A1: a pivotal regulator of innate and adaptive immune systems. **British Journal of Pharmacology**; v. 155, p. 152-169. 2008.
- DAMAZO, A. S.; YONA, S.; D'ACQUISTO, F.; FLOWER, R. J.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 166, p. 1607-1617, Jun., 2005.
- DAMAZO, A. S.; YONA, S.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, p. 4410-4418, Apr., 2006.
- DARNEL, A. D.; WANG, D.; GHABREAU, L. YASMEEN, A.; SAMI, S.; AKIL, N.; AL MOUSTAFA, A. E. Correlation between the presence of high-risk human papillomaviruses and Id gene expression in Syrian women with cervical cancer. **Clinical microbiology and infection**, Paris, v. 16, n.3, p. 262-266, Mar., 2010.
- DE COUPADE, C.; GILLET, R.; BENNOUN, M.; BRIAND, P.; RUSSO-MARIE, F.; SOLITO, E. Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice. **Hepatology**, v. 31, n. 2, p. 371-380, Feb., 2000.
- DIAKONOVA, M.; GERKE, V.; ERNST, J.; LIAUTARD, J. P.; VAN DER VUSSE, G.; GRIFFITHS G. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. **Journal of Cell Science**, v. 110, (Pt10), p. 1199-1213, May, 1997.

- FACIO, JR, F. N.; SENA, A. A.; ARAÚJO, L. P.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; LUZ, MAM; YU, L. ; OLIANI, S. M. Annexin 1 mimetic peptide protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 89, n. 1, p. 51-63, 2011.
- FLOWER, R. J. Eleventh Gaddum Memorial Lecture: Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 94, p. 987-1015, Aug., 1988.
- GASTARDELO, T. S.; DAMAZO, A. S.; DALLI, J.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; OLIANI, S. M. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptors in extravasating neutrophils during acute inflammation. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 174, n. 1, p. 177-183, Jan., 2009.
- GAVINS, F. N.; DALLI, J.; FLOWER, R. J.; GRANGER, D. N.; PERRETTI, M. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 21, n. 8, p. 1751-1758, Jun., 2007.
- GAVINS, F. N.; YONA, S.; KAMAL, A. M.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, New York, v. 101, n. 10, p. 4140-4147, May, 2003.
- GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: From Structure to Function. **Physiol Rev** ; v. 2, p. 331-371, 2002.
- GIBBS, L.; CAROLLO, M. G.; DAMAZO, A. S.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Time-dependent expression of annexin 1 in a model of chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel, v. 51, n. 6, p. 300-306, Jun., 2002.
- GIL, C. D.; 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 biology international**, London, v. 30, n. 4, p. 338-344, Mar., 2006.
- GOULDING, N. J.; GODOLPHIN, J. L.; SHARLAND, P. R.; PEERS, S. H.; SAMPSON, M.; MADDISON, P. J.; FLOWER, R. J. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. **Lancet**, London, v. 335, n. 8703, p. 1416-1418, Jun., 1990.
- 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**, Basingstoke, v. 25, n. 17, p. 2444-2451, Apr., 2006.
- JAAFAR, F.; RIGHI, E.; LINDSTROM, V.; NOHADANI, M.; VAN NOORDEN, S.; LLOYD, T.; POZNANSKY, J.; STAMP, G.; DINA, R.; COLEMAN, D. V.; POZNANSKY, M. C. Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. . **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 175, n. 4, p. 1525-1535, Oct., 2009.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: Cancer Journal of Clinicians**, New York, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr., 2011.
- JIANG, H.; KANG, D. C.; ALEXANDRE, D.; FISCHER, P. B. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 23, p. 12684-12689, Nov., 2000.
- LEE, Y. S. ; CHUNG, H. W. ; MOON, H. S. The expression of annexin I and thymosin beta4 in cervical cancer. **Korean Journal of Obstetrics & Gynecology**, Seoul, v. 51, p. 313-323, Mar., 2008.
- LUO, K. J.; WEN, J.; XIE, X.; FU, J. H.; LUO, R.Z.; WU, Q. L.; HU, Y. Prognostic relevance of Id-1 expression in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. **The Annals of Thoracic Surgery**, Boston, v. 93, n. 5, p. 1682-1688, May, 2012.
- NARISAWA-SAITO, M. ; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, Tokyo, v. 98, n. 10, p. 1505-1511, Oct., 2007.
- OLIANI, S. M. ; DAMAZO, A. S. ; PERRETTI, M. Annexin 1 localization in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators of Inflammation**, Sylvania, v. 11, n. 5, p. 287-292, Oct., 2002.

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

OLIANI, S. M.; CIOCCA G. A.; PIMENTEL, T. A.; DAMAZO, A. S.; GIBBS, L.; PERRETTI, M. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel, v. 57, n. 10, p. 450-456, Oct., 2008.

OLIANI, S. M.; PAUL-CLARK, M. J.; CHRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed post-capillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 158, p. 603-615, Feb., 2001.

PERRETTI, M. ; GAVINS, F. N. 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**, Bethesda, v. 18, p. 60-64, Apr., 2003.

PERRETTI, M.; GETTING, S. J.; SOLITO, E.; MURPHY, P. M.; GAO, J. L. Involvement of the receptor for formylated peptides in the *in vivo* anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 158, n. 6, p. 1969-1973, Jun., 2001.

PONZ-SARVISÉ, MARIANO; CASTAÑÓN, EDUARDO; PANIZO SANTOS, ANGEL; REDRADO, MIRIAM; LÓPEZ, INÉS; ROSELL, DAVID; GIL-ALDEA, ISABEL; CALVO, ALFONSO; NGUEWA, PAUL A.; GIL-BAZO, IGNACIO. Differential Tumor Expression of Inhibitor of Differentiation-1 in Prostate Cancer Patients With Extreme Clinical Phenotypes and Prognostic Implications. **Clinical Genitourinary Cancer**, Oct., 2013.

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

SAMBROOK, J. ; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3th. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHINDL, M.; OBERHUBER, G.; OBERMAIR, A.; SCHOPPMANN, S. F.; KARNER, B.; BIRNER, P. Overexpression of Id-1 Protein Is a Marker for Unfavorable Prognosis in Early-Stage Cervical Cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 15, p. 5703-5706, Aug., 2001.

SHEN, L.; LAN, Z.; SUN, X.; SHI, L.; LIU, Q.; NI, J. Proteomic analysis of lanthanum citrate-induced apoptosis in human cervical carcinoma SiHa cells. **Biomaterials**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1179-1189, Dec., 2010.

SILISTINO-SOUZA, R.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; CURY, P. M.; MANIGLIA, J. V.; RAPOSO, L. S.; TAJARA, E. H.; CHRISTIAN, H. C.; OLIANI, S. M. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **International Journal of Cancer**, New York, v. 120, n. 12, p. 2582-2589, Jun., 2007.

SOLITO, E.; DE COUPADE, C.; CANAIDER, S.; GOULDING, N. J.; PERRETTI M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 2, p. 217-228, May, 2001.

SOLITO, E.; DE COUPADE, C.; PARENTE, L.; FLOWER, R. J.; RUSSO-MARIE, F. Human annexin 1 is highly expressed during the differentiation of the human epithelial cell line A 549. Involvement of NF-IL6 in phorbol ester induction of annexin 1. **Cell Growth and Differentiation**, v. 9, n. 4, p. 327-336, Apr., 1998.

SOLITO, E.; KAMAL, A.; RUSSO-MARIE, F.; BUCKINGHAM, J. C.; MARULLO, S.; PERRETTI M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. **Faseb Journal**, v. 17, n.11, p. 1544-1546, Aug., 2003.

SOLITO, E.; MULLA, A.; MORRIS, J. F.; CHRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; BUCKINGHAM, J. C. Dexamethasone Induces Rapid Serine-Phosphorylation and Membrane Translocation of Annexin 1 in a Human Folliculostellate Cell Line via a Novel Nongenomic Mechanism Involving the Glucocorticoid Receptor, Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Mitogen-Activated Protein Kinase. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1164-1174, Apr., 2003.

SOLITO, E.; NUTI, S.; PARENTE, L. Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, n. 2, p. 347-348, Jun., 1994.

SOTO-DE LEON, S.; CAMARGO, M.; SANCHEZ, R.; MUNOZ, M.; PEREZ-PRADOS, A.; PURROY, A.; PATARROYO, M. E.; PATARROYO, M. A. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, e14705, Feb., 2011.

SU, YAJUAN; GAO, LINGJUAN; TENG, LICHEN; WANG, YING; CUI, JIALIN; PENG, SHIYUN; FU, SONGBIN. Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NF- κ B/MMP-2 signaling pathways. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 132, May, 2013.

VIOLETTE, S. M.; KING, I.; BROWNING, J. L.; PEPUNSKY, R. B.; WALLNER B. P.; SARTORELLI, A. C. Role of lipocortin 1 in the glucocorticoid induction of the terminal differentiation of a human squamous carcinoma. **Journal of Cellular Physiology**, v. 142, n.1, p. 70-72, Jan., 1990.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, London, v. 189, n. 1, p. 12-19, Sep., 1999.

WALLNER, B. P.; MATTALIANO, R. J.; HESSION, C.; CATE, R. L.; TIZARD, R.; SINCLAIR L. K.; FOELLER, C.; CHOW, E. P.; BROWNING, J. L.; RAMACHANDRAN, K. L.; PEPINSKY R. B. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A₂ inhibitor with potential anti-inflammatory activity. **Nature**, v. 320, n. 6057, p. 77-81, Mar., 1986.

YEE, C.; KRISHNAN-HEWLETT, I.; BAKER, C. C.; SCHLEGEL, R.; HOWLEY, P. M. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 119, n. 3, p. 361-366, Jun., 1985.

ZHENG, Y.; CHEN, H.; ZENG, X.; LIU, Z.; XIAO, X.; ZHU, Y.; GU, D.; MEI, L. Surface modification of TPGS-b-(PCL-ran-PGA) nanoparticles with polyethyleneimine as a co-delivery system of TRAIL and endostatin for cervical cancer gene therapy. **Nanoscale Research Letters**, New York, v. 8, n. 1, p.161, Apr., 2013.