

CONIC·SEMESP

13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

TÍTULO: ANÁLISE DA PROTEÍNA ANEXINA A1 E SUA CORRELAÇÃO COM A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM NEOPLASIAS UTERINAS BENIGNAS E MALIGNAS

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO MUNICIPAL DE ENSINO SUPERIOR DE CATANDUVA

AUTOR(ES): SARA DE SOUZA COSTA, NATHÁLIA DIAS SERTÓRIO, RODOLFO TERUO CAMPOS TAKAOKA

ORIENTADOR(ES): ANA PAULA GIROL

COLABORADOR(ES): MAIRTO ROBERIS GEROMEL

Realização:



Apoio:



ANÁLISE DA PROTEÍNA ANEXINA A1 E SUA CORRELAÇÃO COM A PROLIFERAÇÃO CELULAR EM NEOPLASIAS UTERINAS BENIGNAS E MALIGNAS

1. RESUMO

As neoplasias uterinas são causas importantes de desconforto, infertilidade e óbito entre as mulheres no Brasil e no mundo. O câncer de endométrio é um tumor maligno frequente e sua incidência vem aumentando nas últimas décadas. Enquanto, o leiomioma é o tumor uterino benigno mais comum e acomete cerca de 40% das mulheres na idade reprodutiva, sendo relacionado à menorragia, dismenorreia e infertilidade. A proteína anexina A1 (ANXA1) está relacionada à regulação do crescimento celular e tem sido associada ao desenvolvimento da metástase em alguns tumores indicando que essa proteína regula o processo de migração/invasão celular. Contudo, alguns resultados são contraditórios e existem poucos relatos da ANXA1 nas neoplasias uterinas. Por essas razões, analisamos, por imuno-histoquímica, a expressão da ANXA1 e sua correlação com as metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9), bem como com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no leiomioma e no adenocarcinoma de endométrio. Nossos resultados mostraram aumento da expressão da proteína nos tumores benignos e malignos comparados ao tecido uterino normal. Similarmente, observamos expressões aumentadas de MMPs e VEGF nas neoplasias uterinas, o que parece indicar a participação da proteína ANXA1 nos processos de proliferação e invasão celular.

Palavras chave: leiomioma, adenocarcinoma de endométrio, metaloproteinases de matriz, VEGF, biomarcadores tumorais, alvos terapêuticos.

2. INTRODUÇÃO

O carcinoma de endométrio é o tumor ginecológico maligno mais comum em países industrializados e sua incidência vem aumentando nas últimas décadas (PARKIN et al., 2005, JEMAL et al., 2009). A idade média de diagnóstico é por volta dos sessenta anos, embora 20 a 25% dos casos são diagnosticados na pré-menopausa (PARKIN et al., 2005; SIEGEL et al. 2012). Entre os fatores de risco

associados ao desenvolvimento desses tumores estão obesidade, anovulação, nuliparidade e menopausa (SIEGEL et al., 2012).

O diagnóstico de carcinoma de endométrio é normalmente feito durante a avaliação de hemorragia vaginal anormal, sendo que 75% dos tumores de endométrio são diagnosticados numa fase precoce. O sangramento peri ou pós-menopausa anormal é associado ao câncer de endométrio em cerca de 10% dos casos de hiperplasia endometrial atípica a qual pode ser considerada precursora do câncer de endométrio. Além disso, a hiperplasia endometrial coexiste com o câncer em cerca 20% das pacientes (SIEGEL et al., 2012, WEIDERPASS e LABRÈCHE, 2012). O uso da terapia de reposição hormonal combinada estrógeno-progesterona, pode reduzir o risco de carcinoma de endométrio (CRONJ, 2004).

Outra neoplasia comum do trato reprodutivo feminino são os leiomiomas uterinos, ou fibromas, que afetam 30% das mulheres em idade reprodutiva com aumento da incidência para 70-80% aos 50 anos de idade (BAIRD et al., 2003). Os leiomiomas apresentam como sintomas pressão e dores pélvicas, sangramento uterino anormal e disfunção reprodutiva incluindo a redução da fertilidade ou complicações na gravidez (CORONADO et al., 2000). Ainda, os leiomiomas uterinos são causas frequentes de histerectomia (FARQUHAR e STEINER, 2002; OKOGBO et al., 2011).

No desenvolvimento das neoplasias, a invasão das células tumorais é devida a uma série complexa de eventos entre o hospedeiro e o tumor, envolvendo a migração das células tumorais e à desintegração da matriz tumoral. Devido a esse fato, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biologia dos tumores malignos e benignos é essencial para a identificação de candidatos a marcadores prognósticos, novos alvos terapêuticos e estratégias de detecção precoce preditivas de sobrevivência. As investigações que relacionaram a proteína Anexina A1 (ANXA1) à regulação do crescimento celular, juntamente com a sua participação na cascata de sinalização e adesão celular, têm demonstrado um alvo importante para as pesquisas relacionadas com o desenvolvimento tumoral (SILISTINO-SOUZA, RODRIGUES-LISONI et al., 2007; GASTARDELO, 2012).

A ANXA1 é uma proteína de 37 kDa que exhibe sítios de ligação ao cálcio e aos fosfolípidos de membrana, e está envolvida na inibição das sínteses de eicosanoides e fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂), induzidas por glicocorticoides

(GCs), o que confere propriedades anti-inflamatórias a essa proteína (D'ACQUISTO, PERRETTI et al., 2008). Treze membros da família das anexinas foram descritos e clonados em mamíferos, e em humanos, o gene ANXA1, está localizado na região cromossômica 9q12-9q21.2 (HUEBNER, CANNIZZARO et al., 1988; LIM, L. e PERVAIZ, S., 2007).

As anexinas são agrupadas em função das suas características estruturais, incluindo a presença de um núcleo, que é constituído por quatro repetições de 60 a 70 aminoácidos cada, com alta afinidade ao cálcio, ligado a uma sequência N-terminal, que confere especificidade de ação para cada membro da superfamília anexina (D'ACQUISTO, PERRETTI et al., 2008). Uma representação esquemática da estrutura primária e o arranjo tridimensional da ANXA1 são mostrados na figura 1.

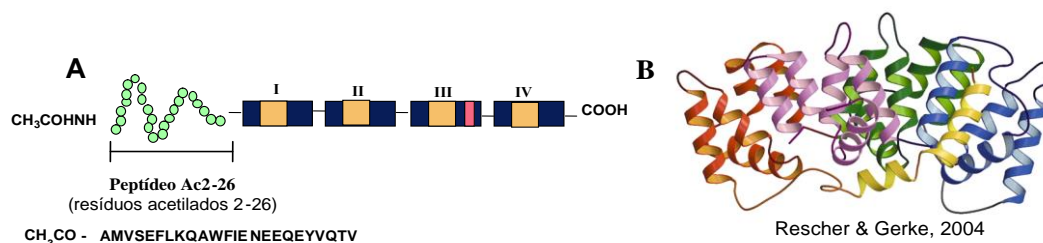


Fig. 1 - (A) Representação esquemática da estrutura primária da proteína anti-inflamatória anexina A1. (B) Ilustração do arranjo tridimensional desta proteína.

A ANXA1 apresenta múltiplas funções em diferentes sistemas e a expressão alterada dessa proteína tem sido associada à transformação celular, progressão tumoral e metástase (LIM, L. H. e PERVAIZ, S., 2007). Uma função interessante da ANXA1 na proliferação celular é o seu papel como substrato para o domínio da tirosina-quinase pertencente ao EGFR inibindo a proliferação de células epiteliais (RADKE, AUSTERMANN et al., 2004). Estudos têm mostrado que a ANXA1 modula a resistência a drogas em tumores e regula a proliferação celular, e ainda, a sua associação no desenvolvimento da metástase em alguns tumores sugere a participação dessa proteína no processo de migração/invasão celular (LIM, L. e PERVAIZ, S., 2007).

No câncer humano o padrão da expressão da ANXA1 não é bem definido. O aumento da expressão dessa proteína foi previamente observado no adenocarcinoma mamário (AHN, SAWADA et al., 1997), carcinoma hepatocelular (MASAKI, TOKUDA et al., 1996), câncer de pâncreas (BAI, NI et al., 2004),

adenocarcinoma de pulmão (LIU, ZHANG et al., 2011) espinocarcinoma cutâneo (PEREZ et al., 2012) e carcinoma de pênis (CALMON, MOTA et al., 2013). Enquanto, outras investigações relataram redução ou perda da expressão da ANXA1 no câncer de cabeça e pescoço (PAWELETZ, ORNSTEIN et al., 2000; GARCIA PEDRERO, FERNANDEZ et al., 2004), esôfago (PAWELETZ, ORNSTEIN et al., 2000), próstata (PAWELETZ, ORNSTEIN et al., 2000; XIN, RHODES et al., 2003), mama (SHEN, CHANG et al., 2005; Perez et al., 2012), linfoma não-Hodgkin (VISHWANATHA, SALAZAR et al., 2004) e adenocarcinoma sinonasal (RODRIGO, GARCIA-PEDRERO et al., 2011). Embora essa discrepância de expressão da ANXA1 ainda necessite ser melhor avaliada, duas sugestões são descritas: diferenças na especificidade tecidual e mudanças dinâmicas de expressão durante a progressão tumoral (KHAU, LANGENBACH et al., 2011).

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

3. OBJETIVOS

Investigar a expressão da ANXA1 e sua correlação com o VEGF e as MMP-2 e MMP-9 em leiominomas uterinos e adenocarcinomas de endométrio.

4. METODOLOGIA

Nesta investigação foi verificada a expressão endógena da proteína ANXA1, por meio do método imuno-histoquímico, em neoplasias uterinas benignas (leiomioma) e malignas (adenocarcinoma de endométrio) comparadas ao tecido uterino normal. Bem como, foi avaliado se essa proteína poderá ser usada como um marcador prognóstico nesses tumores por meio da correlação de sua expressão com o VEGF e as MMP-2 e MMP-9.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1. *Obtenção do Material*

Inicialmente encaminhamos o projeto ao CEP das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) para avaliação e aprovação (Protocolo no. 293.198). A seguir, com a autorização do responsável pelo serviço de Patologia da FIPA, procedemos as buscas nos arquivos desse setor para a seleção de casos de leiomiomas (n=10), adenocarcinomas de endométrio (n=10) e úteros normais (n=10). Os blocos de parafina, contendo fragmentos de biópsias, foram utilizados para a obtenção de cortes de 5µm e, em seguida, processados e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para confirmação dos diagnósticos.

5.2. *Análises imuno-histoquímicas*

A detecção da proteína ANXA1, das enzimas MMP-2 e MMP-9 e do VEGF foi realizada em cortes de 5µm das biópsias selecionadas. As proteínas foram detectadas, por meio dos anticorpos primários policlonais *rabbit*: anti-ANXA1 (1:2000), anti-MMP-2 e anti-MMP-9 (1:200) e anti-VEGF (1:400), diluídos em BSA a 1%. Os cortes foram preparados em lâminas silanizadas e, então: (a) desparafinizados e hidratados em água por 5 minutos; (b) incubados em calor úmido em solução tampão citrato, pH 6,0, por 20 minutos para a recuperação antigênica; (c) lavados em água destilada e deixados em solução de peróxido de hidrogênio (p.a) a 3% em metanol, por 30 minutos, para o bloqueio de peroxidase endógena; (d) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (e) incubados *overnight* com o anticorpo primários policlonais em câmara úmida a 4°C; (f) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (g) incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos; (h) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (i) imersos em complexo estreptavidina peroxidase conjugada por 30 minutos; (j) lavados com PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada); (k) incubados em substrato diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos a 37° C, no escuro, para revelação; (l) lavados em água destilada, contracorados com Hematoxilina e montados.

5.3. Análises Densitométricas e Estatísticas

Para as quantificações das proteínas, após as análises imuno-histoquímicas, foram utilizadas três lâminas de cada condição (n=10 por grupo). Por meio do software *Leica Image Analysis* e objetiva de 40X do microscópio Leica DM500, foram analisados vinte pontos de diferentes regiões para a obtenção de uma média relacionada com a intensidade de imunorreatividade. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias e as médias comparadas pelo test t de *student*. Valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

As análises imuno-histoquímicas e densitométricas revelaram aumento da ANXA1 no adenocarcinoma de endométrio ($p < 0,01$) comparado ao endométrio controle (Figura 1). A expressão aumentada da proteína também ocorreu no leiomioma ($p < 0,001$) com relação ao miométrio normal (Figura 2). Similarmente, observamos aumento na imunorretividade para o VEGF ($p < 0,001$) e as MMP-2 ($p < 0,001$), MMP-9 comparado aos tecidos normais (Figura 3).

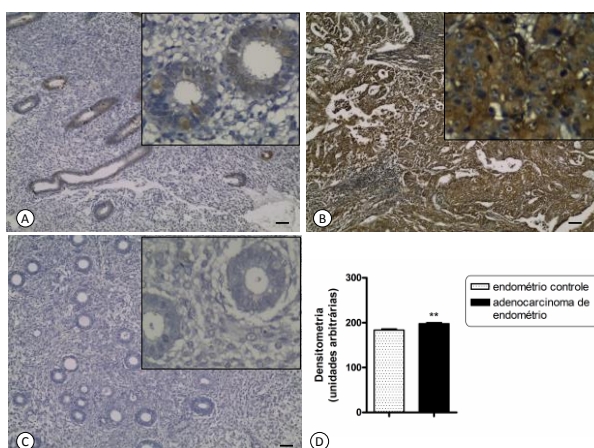


Figura 1: Expressão da ANXA1 no endométrio normal (A) e adenocarcinoma de endométrio (B). Controle da reação (C). Barra: 10 µm. Densitometria da imunorreatividade da ANXA1 (D). Resultados demonstrados como média ± S.E.M. (n=10). **, $p < 0,01$ versus endométrio controle.

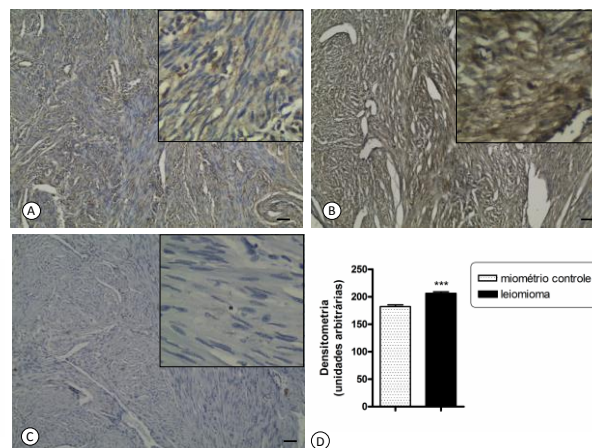


Figura 2: Expressão da ANXA1 no miométrio normal (A) e leiomioma (B). Controle da reação (C). Barra: 10 µm. Densitometria da imunorreatividade da ANXA1 (D). Resultados demonstrados como média ± S.E.M. (n=10). ***, $p < 0,001$ versus miométrio controle.

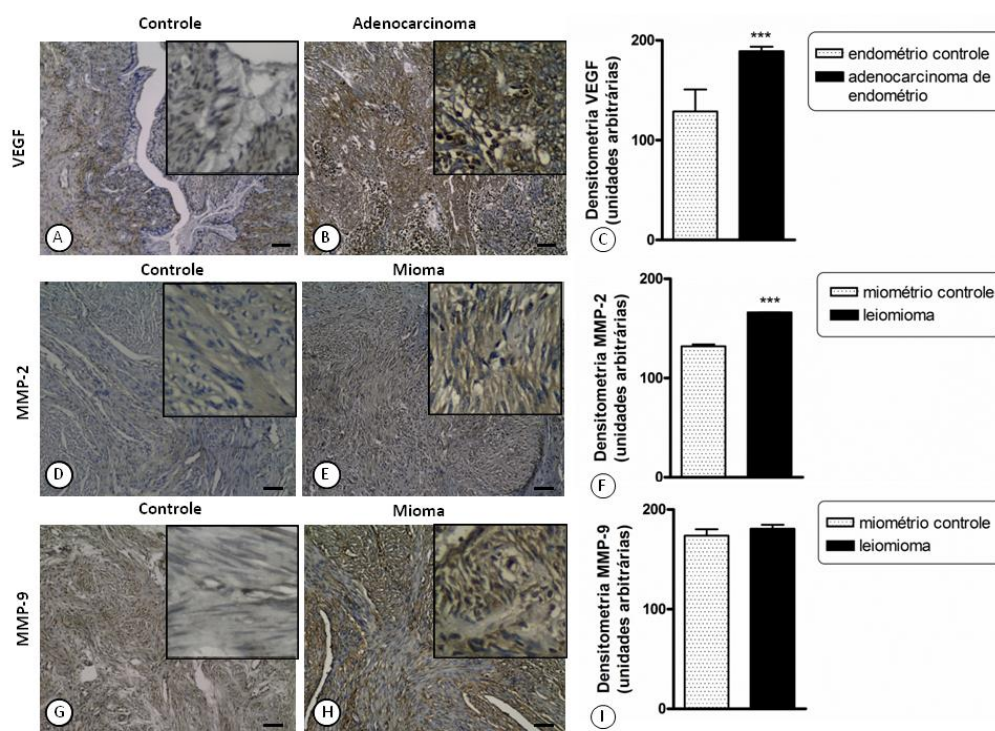


Figura 3: Expressão do VEGF no endométrio normal (A) e adenocarcinoma de endométrio (B). Imunorreatividade para as MMP-2 e MMP-9 nos tecidos controle (D) e (G) e no leiomioma (E) e (F). Barras: 10 μ m. Densitometria da imunorreatividade do VEGF (C), MMP-2 (F) e MMP-9 (I). Resultados demonstrados como média \pm S.E.M. (n=10). ***, $p < 0,001$ versus tecidos controle.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da ANXA1 pode ser correlacionado ao aumento das MMPs e VEGF nos leiomiomas e adenocarcinoma de endométrio e parece estar associado aos processos de proliferação celular nas neoplasias uterinas.

8. FONTES CONSULTADAS

AHN, S. H. et al. Differential expression of annexin I in human mammary ductal epithelial cells in normal and benign and malignant breast tissues. **Clin Exp Metastasis**, v. 15, n. 2, p. 151-6, Mar 1997. ISSN 0262-0898.

BAI, X. F. et al. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 10, p. 1466-70, May 2004. ISSN 1007-9327.

BAIRD DD.; DUNSON, DB.; HILL, MC.; COUSINS, D.; SCHECTMAN, JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol*, 188,100 – 107, 2003.

CALMON, M. F. et al. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. *PLoS One*, v. 8, n. 1, p. e53260, 2013. ISSN 1932-6203.

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

CRONJ, HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Obstet*, 84:101-8, 2004.

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

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

GARCIA PEDRERO, J. M. et al. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol*, v. 164, n. 1, p. 73-9, Jan 2004. ISSN 0002-9440.

HUEBNER, K. et al. Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II. *Oncogene Res*, v. 2, n. 4, p. 299-310, May 1988. ISSN 0890-6467.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, MJ. Cancer statistics 2009. *CA Cancer J Clin*, 59(4):225-249, 2009.

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

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

LIU, Y. F. et al. Identification of annexin A1 as a proinvasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*, v. 28, n. 5, p. 413-25, Jun 2011. ISSN 1573-7276.

MASAKI, T. et al. Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 24, n. 1, p. 72-81, Jul 1996. ISSN 0270-9139.

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

PARKIN, DM.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55:74 – 108, 2005

PATEL, H. B. et al. The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis. **Ann Rheum Dis**, May 2012. ISSN 1468-2060.

PAWELETZ, C. P. et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. **Cancer Res**, v. 60, n. 22, p. 6293-7, Nov 2000. ISSN 0008-5472.

RADKE, S. et al. Specific association of annexin 1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain. **FEBS Lett**, v. 578, n. 1-2, p. 95-8, Dec 2004. ISSN 0014-5793.

RODRIGO, J. P. et al. Down-regulation of annexin A1 and A2 protein expression in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. **Hum Pathol**, v. 42, n. 1, p. 88-94, Jan 2011. ISSN 1532-8392.

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

SHEN, D. et al. Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 326, n. 1, p. 218-27, Jan 2005. ISSN 0006-291X.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; VIRGO, K.; STEIN, K.; MARIOTTO, A.; SMITH, T.; COOPER, D.; GANSLER, T.; LERRO, C.; FEDEWA, S. et al. Cancer treatment and survivorship statistics. **CA Cancer J Clin**, 62(4):220-241, 2012.

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

VISHWANATHA, J. K.; SALAZAR, E.; GOPALAKRISHNAN, V. K. Absence of annexin I expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and cell lines. **BMC Cancer**, v. 4, p. 8, Mar 2004. ISSN 1471-2407.

WEIDERPASS, E.; LABRÈCHE, F. Malignant Tumors of the Female Reproductive System. **Saf Health Work**, 3(3): 166–180. August 2012.

XIN, W. et al. Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression. **Am J Pathol**, v. 162, n. 1, p. 255-61, Jan 2003. ISSN 0002-9440.