

ANEXINA A1 E METALOPROTEINASES DE MATRIZ EM NEOPLASIAS UTERINAS

ANNEXIN A1 AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN UTERINE NEOPLASIAS

ANEXINA A1 Y METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EN NEOPLASIAS UTERINAS

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

Resumo

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

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

Abstract

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

Keywords: Violence against women. Humanizing delivery. Epidemiology. Questionnaires. Depression postpartum.

Resumen

Introducción: El cáncer uterino son las principales causas de malestar, la infertilidad y la muerte entre las mujeres en Brasil y en todo el mundo. En este escenario, la proteína anti-inflamatoria anexina A1 (ANXA1) que se ha asociado con la progresión de los tumores, lo que indican que esta proteína regula la invasión migración / célula. **Objetivo:** analizar, mediante inmunohistoquímica, la expresión de ANXA1 y su correlación con las metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9), así como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en leiomioma y adenocarcinoma endometrial. **Material y Método:** Los análisis se realizaron en biopsias de leiomiomas y adenocarcinomas. Muestras de útero normal se utilizaron como controles. La cuantificación de la expresión de la proteína se realizó por densitometría. **Resultados:** Nuestros resultados mostraron un aumento de expresión de la proteína en los tumores benignos y malignos. **Conclusión:** Del mismo modo, se observó aumento de la expresión de MMPs y el cáncer uterino VEGF, lo que parece indicar la participación de la proteína ANXA1 en la proliferación y la invasión celular.

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

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

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

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

**** Bióloga, mestre em Morfologia pela UNIFESP, doutora em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular e pós-doutora em Imunomorfologia pela UNESP de São José do Rio Preto-SP. Coordenadora do curso de Biomedicina das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA). Professora (nível I) das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia das FIPA e docente da Pós-Graduação em Genética, UNESP de São José do Rio Preto-SP. Contato: anapaulagirol@hotmail.com

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

No desenvolvimento das neoplasias, a invasão das células tumorais é devida a uma série complexa de eventos entre o hospedeiro e o tumor, envolvendo a migração das células tumorais e a desintegração da matriz tumoral. Devido a esse fato, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biologia dos tumores malignos e benignos é essencial para a identificação de candidatos a marcadores prognósticos, novos alvos terapêuticos e estratégias de detecção precoce preditivas de sobrevivência. Nesse cenário, destaca-se a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1) da superfamília das anexinas⁹. Treze membros da família das anexinas foram descritos e clonados em mamíferos e, em humanos, o gene ANXA1 está localizado na região cromossômica 9q12-9q21.2^{10,11}.

A ANXA1 apresenta múltiplas funções em diferentes sistemas e a expressão alterada dessa proteína tem sido associada à transformação celular, progressão tumoral e metástase¹¹. Uma função da ANXA1 na proliferação celular é o seu papel como substrato para

o domínio da tirosina-quinase pertencente ao receptor para fator de crescimento epidérmico (EGFR) inibindo a proliferação de células epiteliais¹¹. A ANXA1 modula a resistência a drogas em tumores e regula a proliferação celular, e ainda, a sua associação no desenvolvimento da metástase em alguns tumores sugere a participação dessa proteína no processo de migração/invasão celular¹¹.

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

MATERIAIS E MÉTODO

Obtenção do material e análises histopatológicas

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) das Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), protocolo nº. 293.198. As análises foram realizadas em biópsias de neoplasias uterinas benignas e malignas, incluídas em parafina, provenientes do Serviço de Patologia da FIPA. Foram selecionados casos de leiomiomas (n=10), adenocarcinomas de endométrio (n=10) e úteros normais (n=10). Os blocos de parafina, contendo fragmentos de biópsias, foram utilizados para a obtenção de cortes de 5µm e, em seguida, processados e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para confirmação dos diagnósticos e pelo método Picrossirius-Hematoxilina e Polarização para evidenciar as fibras de colágeno.

Análises imuno-histoquímicas

A detecção da proteína ANXA1, das enzimas MMP-2 e MMP-9 e do VEGF foi realizada em cortes de 5µm das biópsias selecionadas. Após desparafinização, recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena, as secções foram incubadas com os anticorpos primários policlonais rabbit: anti-ANXA1 (1:2000) (Zymed Laboratories, Cambridge, UK), anti-MMP-2 e anti-MMP-9 (1:200) (Abcam, Cambridge, MA, USA) e anti-VEGF (1:400) (Abcam, Cambridge,

MA, USA), diluídos em BSA a 1%. A seguir, lavadas com PBS pH 7,4, incubadas com o anticorpo secundário biotilado, imersas em complexo *streptavidin-peroxidase* conjugada, reveladas com o substrato diaminobenzidina e contracoradas com Hematoxilina.

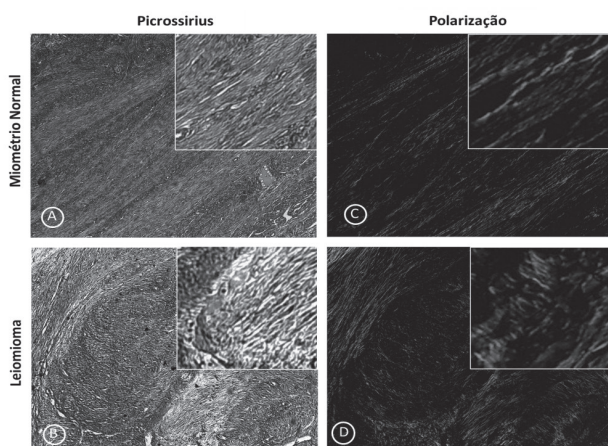
Análises estatísticas

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

RESULTADOS

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

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



As análises imuno-histoquímicas e densitométricas revelaram aumento da ANXA1 no adenocarcinoma de endométrio ($p < 0,01$) comparado ao endométrio controle

(Figura 1). A expressão aumentada da proteína também ocorreu no leiomioma ($p < 0,001$) com relação ao miométrio normal (Figura 2).

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

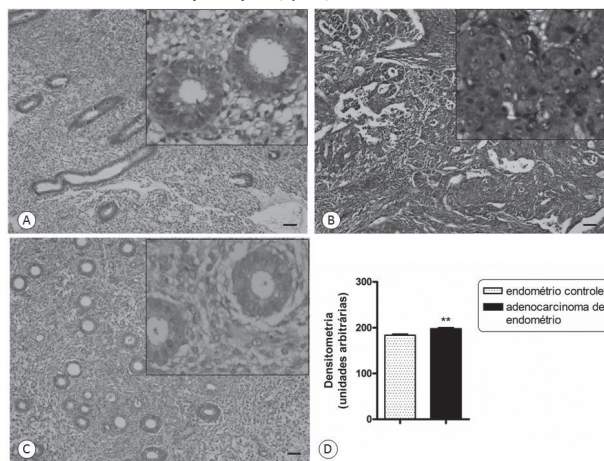
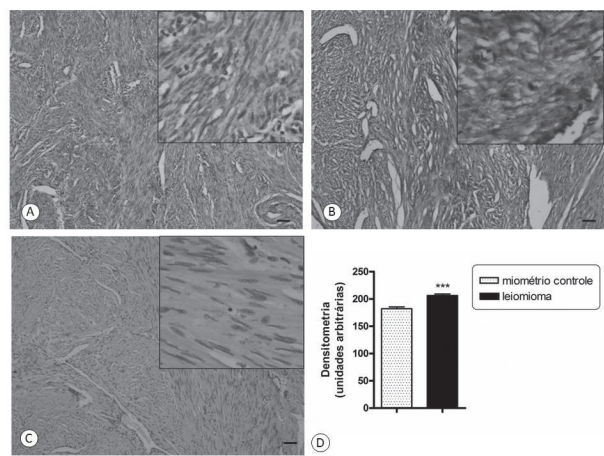
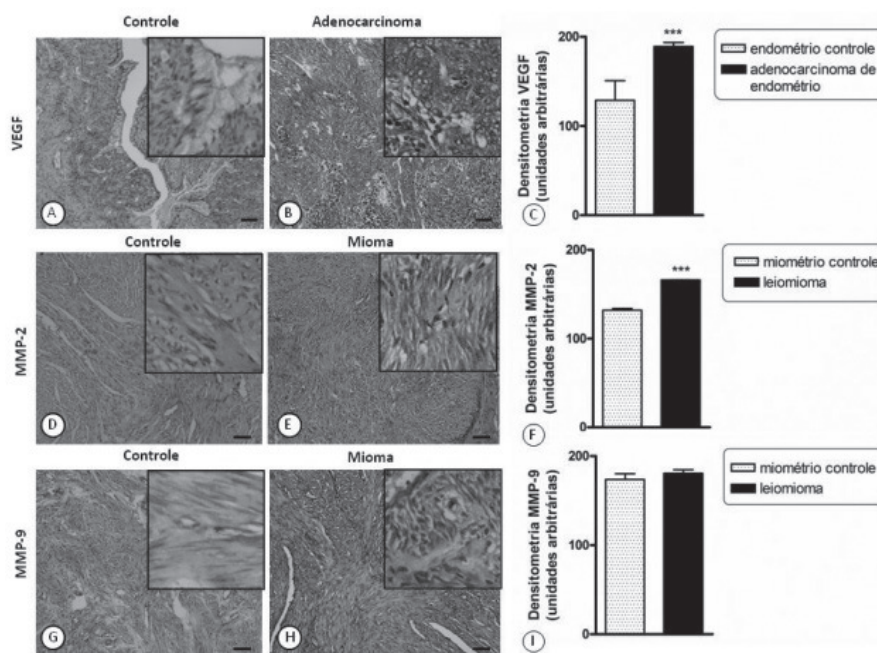


Figura 3 - Expressão da ANXA1 no miométrio normal (A) e leiomioma (B). Controle da reação (C). Barra: 10 μ m. Densitometria da imunorreatividade da ANXA1 (D). Resultados demonstrados como média \pm S.E.M. (n=10). ***, $p < 0,001$ versus miométrio controle



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

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



DISCUSSÃO

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

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

Por outro lado, alguns pesquisadores observaram

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

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

Em relação ao VEGF, observamos aumento da sua expressão nos adenocarcinomas de endométrio, comparado aos tecidos normais; corroborando com dados encontrados na literatura, indicando que o aumento da expressão do VEGF está relacionado com a angiogênese, criando um ambiente propício para o crescimento

dessas neoplasias uterinas²¹. O mesmo padrão não foi observado no leiomioma, onde a expressão do VEGF não teve significância estatística. Dados controversos foram constatados em outra pesquisa, nas quais foi relatado o aumento do VEGF em leiomiomas pelos mesmos fatores²².

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

Nossos resultados com relação às MMPs também mostraram aumento da expressividade de MMP-2 e MMP-9 nos leiomiomas. Similarmente, foi observado aumento da expressão das MMP-2 e MMP-9 em um estudo realizado por Chang et al.²⁵ em neoplasias do miométrio. Por outro lado, observamos diminuição das expressões dessas MMPs nos adenocarcinomas de endométrio, corroborando assim com outros pesquisadores²⁶.

As análises de polarização, após a coloração de Picrossirius-Hematoxilina, evidenciaram fibras de colágeno mais imaturas no leiomioma em relação ao miométrio normal, indicando maior renovação. O que pode ser correlacionado ao aumento das MMPs nesse tecido. Nosso resultado corrobora com outro estudo que indica que MMP-2 medeia a clivagem de colágeno tipo IV e outros componentes da matriz extracelular, levando a instabilidade da estrutura da matriz²⁷.

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

CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar; 65(2):87-108.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan; 66(1):7-30.
- Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(4):220-41.
- Cronjé HS. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int J Gynecol Obstet.* 2004; 84(2):101-8.
- Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188(1):100-7.
- Coronado GD, Marshall LM, Schwartz SM. Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population-based study. *Obstet Gynecol.* 2000; 95(95):764-9.
- Farquhar CM, Steiner CA. Hysterectomy rates in the United States 1990-1997. *Obstet Gynecol.* 2002; 99(2):229-34.
- Okogbo FO, Ezechi OC, Loto OM, Ezeobi PM. Uterine leiomyomata in South Western Nigeria: a clinical study of presentations and management outcome. *Afr Health Sci.* 2011 Jun; 11(2):271-8.
- D'acquistio F, Perretti M, Flower R. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol.* 2008 Sep; 155(2):152-69.
- Huebner K, Cannizzaro LA, Frey AZ, Hecht BK, Hecht F, Croce CM, et al. Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II. *Oncogene Res.* 1988 May; 2(4):299-310.
- Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* 2007 Apr; 21(4):968-75.
- Radke S, Austermann J, Russo-Marie F, Gerke V, Rescher U. Specific association of annexin 1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain. *FEBS Lett.* 2004 Dec; 578(1-2):95-8.
- Shen D, Chang HR, Chen Z, He J, Lonsberry V, Elshimali Y, et al. Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326(1):218-27.
- Bai XF, Ni XG, Zhao P, Liu SM, Wang HX, Guo B, et al. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2004 May; 10(10):1466-70.
- Cicek M, Samant RS, Kinter M, Welch DR, Casey D. Identification of metastasis-associated proteins through protein analysis of metastatic MDA-MB-435 and metastasis-suppressed BRMS1 transfected-MDA-MB-435 cells. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(2):149-57.
- García Pedrero JM, Fernandez MP, Morgan RO, Herrero Zapatero A, Gonzalez MV, Suarez Nieto C, et al. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol.* 2004;164(1):73-9.
- Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Llorente JL, Fresno MF, Allonca E, Suarez C, et al. Down-regulation of annexin A1 and A2 protein expression in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 2011 Jan; 42(1):88-94.

18. Nomura H, Uzawa K, Yamano Y, Fushimi K, Nakashima D, Kouzu Y, et al. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Jul;135(7):943-9.
19. Wang LD, Yang YH, Liu Y, Song HT, Zhang LY, Li PL. Decreased expression of AnnexinA1 during the progression of cervical neoplasia. *J Int Med Re*. 2008; 36(4):665-72.
20. Khau T, Langenbach SY, Schuliga M, Harris T, Johnstone CN, Anderson RL, et al. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2. *FASEB J*. 2011 Feb; 25(2):483-96.
21. Puduvalli VK, Sawaga R. Antiangiogenesis therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. *J Neurooncol*. 2000; 50(1-2):189-200.
22. Gentry CC, Okolo SO, Fong LFW, Crow JC, Maclean AB, Perrett CW. Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium. *Clin Sci*. 2001;101(6):691-5.
23. Amălinei C, Căruntu ID, Giuscă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51(2):215-28.
24. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26(3-4):717-24.
25. Chang CC, Kuan TC, Hsieh YY, Ho YJ, Sun YL, Lim CS. Effects of diosgenin on myometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 activity and expression in ovariectomized rats. *Int J Biol Sci*. 2011;7(6):837-47.
26. Talvensaaari-Mattila A, Santala M, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2005; 25(6B):4101-5.
27. Korompelis P, Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiogou G, Korkolopoulou P, Sepsa A, et al. Expression of vascular endothelial factor-A, gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-1 in uterine leiomyomas. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Aug; 53(9):1415-24.

Recebido em: 15/04/2016

Aceito em: 29/09/2016